



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

Ispezione al macello bovino: screening  
istologico per l'individuazione di trattamenti  
ormonali illeciti

Candidato: Federico Biagini

Relatore: Dott. Lorenzo Castigliego

Correlatore: Dott. Ranieri Verin

*ANNO ACCADEMICO 2012/2013*

*Alla mia famiglia*



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>6</b>
<b>2. LE SOSTANZE UTILIZZATE A SCOPO ANABOLIZZANTE.....</b>	<b>11</b>
2.1 Steroidi.....	11
2.2 Ormoni sessuali.....	12
2.2.1 Estrogeni.....	13
2.2.2 Androgeni.....	16
2.2.3 Gestageni o Progestinici.....	18
2.2.4 Effetti degli ormoni sessuali nei bovini.....	21
2.2.5 Controlli sull'uso illecito degli ormoni sessuali.....	23
2.2.6 Il problema dei residui di ormoni sessuali.....	26
2.2.6.1 I potenziali effetti sulla salute umana per esposizione agli ormoni sessuali.....	27
2.3 Corticosteroidi.....	31
2.3.1 Glicocorticoidi.....	32
2.3.1.1 Effetti tossici sull'uomo dei residui di glicocorticoidi negli alimenti.....	37
2.4 $\beta$ -agonisti.....	38
2.4.1 Effetti sulla salute umana dei residui di $\beta$ -agonisti.....	42
2.5 Tireostatici.....	44
<b>3. IL CONTROLLO DEI RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE.....</b>	<b>47</b>
3.1 Il Piano Nazionale Residui.....	47
3.1.1 L'esame istologico.....	52
3.2 Legislazione vigente.....	57
3.2.1 Disputa sull'impiego degli ormoni tra UE e USA.....	60
3.3 I controlli analitici.....	63
3.3.1 I metodi di screening e di conferma.....	66
<b>4. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>72</b>

<b>5. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>73</b>
<b>6. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>85</b>
<b>7. CONCLUSIONI.....</b>	<b>107</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>108</b>
<b>9. RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>119</b>

## **Riassunto**

Nell'Unione Europea, l'uso di promotori di crescita ad azione ormonale, quali ormoni sessuali e corticosteroidi, è vietato nell'allevamento dei bovini da carne, al fine di tutelare la salute dei consumatori dalla presenza di residui potenzialmente pericolosi nei prodotti derivati. Ogni Stato Membro, allo scopo di verificare l'ottemperanza al divieto imposto, predispone annualmente un piano di controllo (PNR), per la ricerca nei tessuti e nelle matrici biologiche, mediante metodi chimici quali-quantitativi, di residui di sostanze che si presume possano essere utilizzate illecitamente. Per quanto riguarda i bovini, è stato recentemente preso in considerazione l'esame istopatologico, quale metodo di screening, poiché in grado di rilevare le gravi lesioni provocate dai trattamenti ormonali a carico degli organi bersaglio, le quali permangono per un tempo abbastanza lungo da poter essere svelate al momento della macellazione. In tal modo, sarebbe possibile evidenziare l'impiego illecito di promotori della crescita, anche se tale approccio analitico non consente un'identificazione a livello di singola molecola.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di effettuare un'indagine sulla prevalenza di bovini da carne potenzialmente trattati con sostanze ormonali illecite, in uno stabilimento di macellazione operante sul territorio nazionale. A tal fine, è stato realizzato uno studio multilivello su 90 animali (50 maschi e 40 femmine, di età compresa tra gli 11 e i 18 mesi), basato su osservazioni cliniche e comportamentali di ogni soggetto, sull'eventuale riscontro di lesioni anatomo-patologiche macroscopiche a carico di alcuni organi bersaglio (timo, prostata e ghiandola bulbo-uretrale) e sull'esame istologico, quale metodo di screening, di campioni di tali organi. Mentre non sono state riscontrate alterazioni alla visita ante-mortem e post-mortem, all'esame istologico sono stati evidenziati 6 casi (6,7%) di grave atrofia timica, caratterizzata da una notevole deplezione linfocitaria con sostituzione di cellule adipose. Questo quadro istopatologico, in assenza di un'eventuale denuncia di somministrazione farmacologica a scopo terapeutico, può essere associato ad un trattamento sospetto con corticosteroidi. Pertanto, i risultati di questa indagine suggeriscono che, nonostante una rigida legislazione a riguardo e l'attuazione del PNR, il problema dei trattamenti illeciti con sostanze ormonali sia ancora di preoccupante attualità.

**Parole chiave:** trattamenti ormonali illeciti, bovini da carne, residui, istopatologia

## **Abstract**

In the European Union, the use of growth promoters with hormonal action, such as sex hormones and corticosteroids, has been banned in beef cattle breeding, in order to protect the consumer from the presence of potentially dangerous residues in food products. Each Member State, to verify the enforcement of the ban imposed, carries out an annual control plan on residues (PNR), which, using quali-quantitative chemical analytical methods, is aimed at uncovering the presence of forbidden substances in tissues and biological matrices. Recently, in cattle, the histopathological examination has been introduced with screening purposes, due to the fact that it allows to detect the typical lesions provoked by the hormonal treatments to their target organs. Such lesions persist for a time long enough to be revealed at the slaughterhouse. In such a way, it would be possible to highlight the illegal use of growth promoters, although such an approach does not permit an identification at the level of single molecule.

The aim of this thesis was to perform a survey on the prevalence of beef cattle potentially treated with illegal hormonal substances, in a slaughterhouse operating on the national territory. To this aim, a multilevel study was carried out on 90 animals (50 males and 40 females, 11-18 months old), based on clinical and behavioral observations of each subject, on the possible detection of anatomo-pathological macroscopic lesions of some target organs (thymus, prostate and bulbo-urethral gland) and on the histological examination on samples of these organs, as method of screening. During the ante-mortem and post-mortem inspection, no relevant alterations were found. At the histological analysis, 6 cases (6.7%) of severe thymic atrophy were highlighted, characterized by a remarkable lymphocyte depletion with replacement of fat cells. This histopathological picture, in the absence of any allegation of therapeutic drug administration, represents a strong indication of treatments with corticosteroids. Therefore, the results of this survey suggest that, despite the existence of a strict legislation and the implementation of the PNR, the problem of illegal treatments with hormonal substances is still of topical concern.

**Keywords:** illegal hormonal treatments, beef cattle, residues, histopathological screening

# 1. INTRODUZIONE

Le proteine animali rappresentano una componente basilare nell'alimentazione della maggioranza della popolazione mondiale. Il 30% del fabbisogno proteico deriva da prodotti di origine animale, come carne, latte e uova, e la sempre crescente domanda di alimenti proteici ha indotto gli allevatori ad avvalersi, oltre alle tecniche di miglioramento genetico, con la selezione di soggetti più produttivi, al miglioramento delle tecniche di produzione, trasformazione e conservazione di mangimi e foraggi e al controllo delle malattie, anche di sostanze anabolizzanti (Cini *et al.*, 2006). Si tratta di sostanze chimiche, generalmente di natura steroidea, definite anche “fattori di crescita”, che favoriscono l'anabolismo proteico agendo sui fattori di conversione dell'azoto proteico durante la trasformazione delle materie nutritive in tessuto vivente (FAO-OMS, 1975), determinando quindi un miglioramento dell'efficienza di conversione dell'alimento, un aumento della massa muscolare e una diminuzione dei grassi di deposito.

L'utilizzo di questi fattori di crescita è vietato nell'Unione Europea sin dal 1981 con l'emanazione della Direttiva 81/602/CEE (abrogata dalla Direttiva 96/22/CE e successive modifiche), mentre in altri paesi, come gli Stati Uniti d'America (USA), l'utilizzo di alcune sostanze ormonali è consentito sotto stretto controllo veterinario.

Negli anni '60 erano molto diffusi i tireostatici, un complesso gruppo di sostanze che agiscono come inibitori degli ormoni secreti dalla ghiandola tiroide, Tiroxina (T4) e Triiodotironina (T3). Somministrati con l'alimento nelle ultime 4-8 settimane prima della macellazione, i tireostatici, rapidamente assorbiti, prevengono la sintesi degli ormoni tiroidei e riducono gli effetti attivatori del metabolismo (gliconeogenetico, lipolitico, calorigeno) da questi esercitato (Ferrero *et al.*, 1989).

L'effetto metabolico che viene sfruttato è quello di un aumento della ritenzione idrica nei tessuti (caso delle carni “gonfiate”). Inoltre, l'animale va incontro a coprostasi e urinostasi, che, unitamente all'imbibizione idrica dei tessuti, comportano un aumento fraudolento del peso non accompagnato da un maggiore valore nutritivo (Ferrero *et al.*, 1989). I tireostatici sono stati abbandonati, perché causavano ipertrofia della tiroide, facilmente rilevabile dopo la macellazione dell'animale e inoltre costituivano un rischio per la salute dell'uomo, a causa della presenza dei residui nella carne. Il consumo di carne contenente residui di tireostatici e relativi metaboliti ha causato un aumento dei

casi in Spagna di *aplasia cutis*, caratteristica malattia del cuoio capelluto (Courtheyn *et al.*, 2002).

Negli anni '70 hanno preso il sopravvento, soprattutto nei paesi anglosassoni, gli stilbenici, in particolare il DES (dietilstilbestrolo), per il suo basso costo. Gli stilbenici sono composti similsteroidi di sintesi, in grado di produrre attività ed effetti analoghi a quelli degli ormoni steroidi endogeni. Entrambi hanno un meccanismo d'azione comune caratterizzato dal legame con recettori specifici di natura proteica situati all'interno delle cellule bersaglio. Il complesso ormone-recettore influenza l'attività genetica facendo aumentare la sintesi delle proteine. Si ottiene pertanto un incremento della velocità di crescita e un maggior fabbisogno energetico, che induce una diminuzione della deposizione di grasso (Swenson e Reece, 2002). Il DES, molecola di sintesi ad azione estrogeno-simile, se somministrato per lunghi periodi a basse dosi (0,1-2 ng/kg) induce nell'animale da esperimento alterazioni istologiche nel fegato, nel rene e ne compromette le funzioni riproduttive, mentre a dosi elevate in periodi critici della gravidanza determina nella prole effetti teratogeni sull'apparato urogenitale e sterilità ([www.nuovaitaliamedica.it](http://www.nuovaitaliamedica.it)).

L'utilizzo del DES è stato autorizzato fino al 1979, anno in cui è stata dimostrata la sua attività cancerogena, già sospettata anni prima a causa di un'aumentata incidenza di adenocarcinomi della vagina e del collo dell'utero nelle ragazze adolescenti, le cui madri avevano assunto DES in gravidanza, prescritto a quel tempo per una sua presunta, ma mai dimostrata azione antiabortiva (Herbst e Scully, 1970). Da allora sono stati progressivamente banditi tutti gli stilbenici. Negli anni '80 oltre il 50 % dei prodotti sequestrati nei Paesi Europei conteneva un *cocktail* di stilbeni, presenti solo sul mercato nero, e ormoni steroidi sessuali.

Gli steroidi sessuali naturali (17 $\beta$ -estradiolo, progesterone e testosterone) sono sostanze normalmente presenti nell'organismo animale. Gli steroidi sessuali di sintesi possono essere composti in grado di liberare in vivo l'ormone naturale (estradiolo benzoato, testosterone palmitato) oppure molecole che mimano l'attività degli ormoni naturali ma sono soggette a più lenta metabolizzazione (etilestradiolo, metiltestosterone, trenbolone). L'effetto anabolizzante di tali sostanze è dovuto alla ritenzione di azoto nell'organismo, con aumento nelle carni della parte magra rispetto alla deposizione di grasso (Hafez, 1984).

L'UE vieta l'impiego anabolizzante degli steroidi sessuali (Direttiva 96/22/CE e successive modifiche). In Italia l'utilizzo di alcuni steroidi sessuali è consentito solo su

animali d'azienda non da produzione per fini terapeutici o zootecnici (D. Lgs. 158/2006, modificato dal D. Lgs. 148/2009). Negli USA queste sostanze sono consentite senza obbligo di rispettare i tempi di sospensione per gli steroidi naturali e con tempi di sospensione di 60-65 giorni dall'impianto (in genere nel sottocute dell'orecchio) per gli steroidi di sintesi ([www.farmacovigilanza.org](http://www.farmacovigilanza.org)).

Negli anni '90 si è diffuso sia l'impiego di ormoni steroidei sessuali combinati con farmaci del doping sportivo sia di  $\beta$ -agonisti. I  $\beta$ -agonisti sono molecole di sintesi con struttura chimica simile all'adrenalina e noradrenalina, epinefrine naturali liberate dagli organismi animali in situazione di stress, quali la paura, il combattimento o la fuga da predatori. I  $\beta$ -agonisti, somministrati in piccole dosi e per via orale con l'alimento, si legano a recettori cellulari in sostituzione di adrenalina e noradrenalina, determinando un aumento delle sintesi proteiche muscolari e una notevole riduzione dei depositi adiposi (entrambi fino al 40%). Il loro uso in veterinaria è autorizzato solo per scopi terapeutici. I  $\beta$ -agonisti infatti agiscono come broncodilatatori e tocolitici, mentre sono vietati per altri usi. E' stato dimostrato, inoltre, che i loro residui nelle produzioni animali possono provocare nel consumatore sintomi di tipo acuto come tremori, cefalea, tachicardia e interferenza con il parto nella donna, oppure di tipo cronico, quali una possibile attività mutagena e/o cancerogena (Courtheyn, 2002).

Un'altra sostanza che è vietata nell'UE mentre è autorizzato il suo uso negli USA è la somatotropina bovina ricombinante (rBST) (Decisione del Consiglio 1999/879/CE). Si tratta della copia di sintesi della somatotropina o ormone della crescita (GH), ormone peptidico prodotto dall'adenoipofisi la cui funzione principale è di stimolare lo sviluppo dell'organismo, promuovendo l'accrescimento delle cellule di quasi tutti i tessuti corporei, l'incremento della massa muscolare e la diminuzione di quella grassa. L'ormone della crescita è facilmente riprodotto in laboratorio con la tecnica del DNA ricombinante ed è messo in commercio dall'ELI Lilly con il nome di Posilac o Lactotropin e dalla LG Life Science con il nome di Hilac o Boostin.

La somatotropina bovina ricombinante viene somministrata per via intramuscolare o sottocutanea tramite preparazioni a lento rilascio, seguendo poi le stesse vie metaboliche dell'ormone della crescita. Negli animali in lattazione la somministrazione di rBST determina un incremento della produzione di latte, migliora l'assorbimento dei nutrienti apportati con la dieta e riduce la deposizione di grasso in modo da rendere disponibile una maggiore quota di componenti per la sintesi del latte (Pace e Settineri, 1996).

Secondo il comitato scientifico SCAHAW (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare) la somministrazione di rBST nei bovini da latte è in diretta correlazione con un incremento dei casi di mastite e di patologie podali, oltre a provocare lesioni nel sito di iniezione del farmaco, disturbi all'apparato riproduttivo e indurre uno stato di stress nell'animale ([http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out21\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out21_en.pdf)). Il comitato scientifico SCVPH (Scientific Committee on Veterinary measures relating to Public Health) invece ha espresso dei pareri riguardanti aspetti di sanità pubblica. In particolare, è possibile che residui del farmaco si possano ritrovare nel latte e nelle carni degli animali trattati, ma soprattutto è dimostrato che la somministrazione di rBST determini un aumento della concentrazione di IGF-1 (Insuline Growth Factor) nel latte (Castigliego *et al.*, 2009). Ricerche epidemiologiche condotte in campo umano su pazienti esposti a concentrazioni molto elevate di IGFs, hanno dimostrato un'aumentata incidenza di patologie preneoplastiche e neoplastiche a livello intestinale, prostatico, polmonare e mammario (Klein *et al.*, 1982; Pines *et al.*, 1985; Matano *et al.*, 2005).

Oggi la maggior parte dei residui illeciti negli alimenti di origine animale sono riferibili ad ormoni sessuali, cortisonici e  $\beta$ -agonisti. Queste sostanze vengono spesso impiegate sotto forma di associazioni, ad esempio estrogeni con androgeni o gestageni oppure veri e propri *cocktails* che possono contare anche 30 componenti diversi a base di estrogeni, androgeni, gestageni,  $\beta$ -agonisti e corticosteroidi (Biolatti *et al.*, 2003).

Questi composti vengono somministrati agli animali per via parenterale (iniezione), via transcutanea (pour-on), via orale o mediante impianto sottocutaneo.

I corticosteroidi sono composti frequentemente usati in medicina umana e veterinaria, spesso associati ad antibiotici e  $\beta$ -agonisti. E' illegale l'uso dei cortisonici fluorati (desametasone, triamcinolone, flumetazone) o quelli del gruppo del prednisone (Courtheyn *et al.*, 2002).

Le molecole, naturali o di sintesi, utilizzate a scopo anabolizzante appartengono principalmente alle seguenti categorie (Biolatti *et al.*, 2003):

- Ormoni steroidi sessuali naturali e di sintesi:
  - Estrogeni: 17 $\beta$ -estradiolo; etinilestradiolo; dietilstilbestrolo
  - Androgeni: testosterone; stanozololo; metiltestosterone; trenbolone
  - Gestageni: progesterone; clormadinone acetato; medrossiprogesterone acetato

- Cortisonici:
  - desametasone; triamcinolone; prednisolone
- $\beta$ -agonisti:
  - clenbuterolo; salbutamolo, mabuterolo; mapenterolo
- Tireostatici:
  - Metiltiouracile; tapazolo
- Ormone della crescita:
  - Somatotropina ricombinante





genera i composti C19, androgeni. Con l'ulteriore eliminazione della funzione metilica C19 e la conversione del primo anello esagonale in struttura fenolica, si ottengono i composti C18, gli estrogeni.

In termini generali, gli ormoni steroidei sono elementi essenziali per il normale sviluppo dell'organismo e per lo svolgimento delle funzioni fisiologiche della maggior parte dei tessuti, e la loro sintesi è strettamente controllata grazie a specifici meccanismi di controregolazione.

In base agli effetti farmacologici e alle attività biologiche, gli ormoni steroidei si suddividono in ormoni sessuali, che comprendono gli estrogeni, gli androgeni e i progestinici, e in corticosteroidi, distinti in glicocorticoidi e mineralcorticoidi.

Gli ormoni sessuali presiedono alla differenziazione sessuale e alla riproduzione, mentre i corticosteroidi sono coinvolti nella regolazione del metabolismo e della funzione immunitaria (glicocorticoidi), e nella regolazione del volume ematico e del contenuto elettrolitico (mineralcorticoidi). In entrambi i casi si distinguono gli ormoni naturalmente presenti nell'organismo (steroidi endogeni) da quelli di sintesi o di origine xenobiotica (steroidi esogeni) (Aguggini *et al.*, 1998; <http://www.treccani.it/enciclopedia/steroide/>).

## **2.2 Ormoni sessuali**

Gli ormoni sessuali sono sostanze che hanno la funzione di regolare le funzioni metaboliche e riproduttive degli essere viventi e, come detto in precedenza, vengono suddivisi in tre classi (Prezioso e Prezioso, 1999):

- Estrogeni: ormoni sessuali femminili che svolgono un ruolo attivo nello sviluppo del sistema riproduttivo e dei caratteri sessuali secondari femminili, e in combinazione con i progestinici, presiedono allo svolgimento del ciclo sessuale;
- Androgeni: ormoni sessuali maschili indispensabili per lo sviluppo dei caratteri sessuali primari e secondari e per la produzione degli spermatozoi;
- Gestageni o Progestinici: ormoni sessuali femminili prodotti dal corpo luteo che hanno la funzione di preparare l'utero all'impianto della cellula uovo fecondata e di regolare il mantenimento della gravidanza.

### 2.2.1 Estrogeni

Gli estrogeni sono secreti principalmente dalle ovaie e la loro sintesi è regolata dalle gonadotropine prodotte dall'adenoipofisi, ovvero l'ormone follicolo-stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH). L'FSH stimola l'accrescimento follicolare e la produzione di estrogeni da parte delle cellule della granulosa. L'LH, invece, è coinvolto principalmente nella sintesi di androgeni ed altri precursori degli estrogeni da parte delle cellule della teca interna. Quest'ultime, infatti, producono, sotto lo stimolo dell'LH, steroidi androgeni (androstenedione e testosterone), che diffondono all'interno del follicolo, dove le cellule della granulosa operano la loro trasformazione in estrogeni, per azione di FSH. Le gonadotropine ipofisarie sono controllate da un neuro-ormone ipotalamico (GnRh), che a sua volta è sottoposto a regolazione mediante un meccanismo di retroazione da parte dell'estradiolo. Gli estrogeni vengono prodotti in minima quantità anche dalla corteccia surrenale e dal testicolo (mediante l'aromatizzazione del testosterone ad opera del sistema enzimatico 5-alfa-aromatasi). Inoltre, alla loro produzione può concorrere anche la placenta (Aguggini *et al.*, 1998).

Gli estrogeni intervengono sui seguenti distretti fisiologici (Preziuso e Preziuso, 1999):

- Follicolo ovarico: in sinergismo con l'FSH, inducono proliferazione e maturazione delle cellule della granulosa e la formazione su di esse di recettori per le gonadotropine;
- Utero: determinano iperemia, iperplasia, ipertrofia e aumento dello spessore epiteliale (formazione di creste e cripte); nel parto esplicano una funzione mioeccitatoria uterina e un'azione preparatoria per altri ormoni, quali ossitocina, prostaglandine e relaxina;
- Vagina: inducono un incremento dell'attività mitotica e degli strati epiteliali, oltre a corneificazione e desquamazione degli strati superficiali dell'epitelio e edema della vulva. Inoltre creano le condizioni adatte alla sopravvivenza ed al trasporto degli spermatozoi;
- Encefalo: svolgono azioni neuroendocrine e comportamentali;
- Mammella: stimolano l'accrescimento ghiandolare;
- Metabolismo: esercitano, in particolare nel bovino, un'azione positiva sul metabolismo proteico, determinando ritenzione di azoto e crescita tissutale (accrescimento ed incremento ponderale); nei riguardi del metabolismo lipidico esplicano azione lipotropa, riducendo la concentrazione ematica di lipidi e

prevenendone la deposizione a livello epatico. Inoltre, agiscono sul metabolismo del calcio, favorendo la deposizione di calcio nell'osso e su quello idro-salino, determinando un effetto edematogeno, per l'aumento del flusso liquido dai capillari allo spazio intracellulare.

I principali estrogeni prodotti dai mammiferi, compreso l'uomo, sono il  $17\beta$ -estradiolo (figura 2), l'estrone e l'estriolo, che vengono sintetizzati a partire dal colesterolo, via pregnenolone e progesterone. In zootecnia, gli estrogeni sono tra gli ormoni più utilizzati, sia da soli che in associazione con altri agenti anabolizzanti. La loro somministrazione determina negli animali un aumento della crescita dal 5 al 15 %, un incremento della deposizione di proteine nel muscolo scheletrico ed una ritenzione di azoto nell'organismo (Meyer, 2001).

Nel trattamento illegale degli animali da allevamento vengono utilizzati non solo estrogeni naturali come il  $17\beta$ -estradiolo, ma anche estrogeni di sintesi, tra cui gli stilbenici, e composti di origine fungina, come lo zearanolo (Figura 3). Quest'ultimo è un derivato dello zearalenone, che è possibile ritrovare nel foraggio destinato all'alimentazione del bestiame. L'assunzione protratta per lungo tempo di cereali contaminati da questa micotossina può provocare nell'animale iperplasia uterina, disturbi della fertilità, riduzione del peso fetale, nonché mortalità neonatale (Cini *et al.*, 2006).

Tutti gli estrogeni possono svolgere la loro attività in modo diretto legandosi ai recettori specifici presenti in alta concentrazione nel tessuto dell'utero. Anche nel muscolo scheletrico dei bovini sono stati individuati i recettori per gli estrogeni, con caratteristiche fisico-chimiche e biochimiche simili a quelle dei recettori uterini, seppur in concentrazione notevolmente inferiore. Gli estrogeni sono in grado di agire anche in maniera indiretta stimolando la secrezione dell'ormone della crescita (GH) e l'espressione dei recettori specifici per il GH stesso, cui si associa una più elevata produzione di insulina e una maggiore ritenzione azotata (Meyer, 2001).

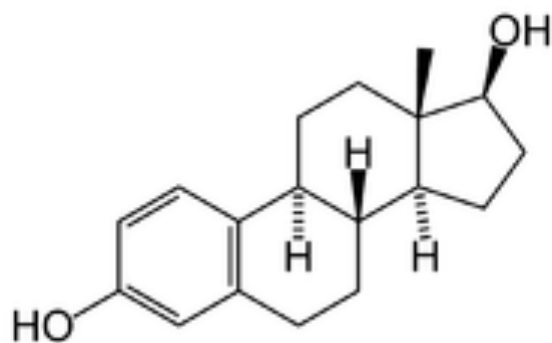


Figura 2. Struttura del 17β-estradiolo

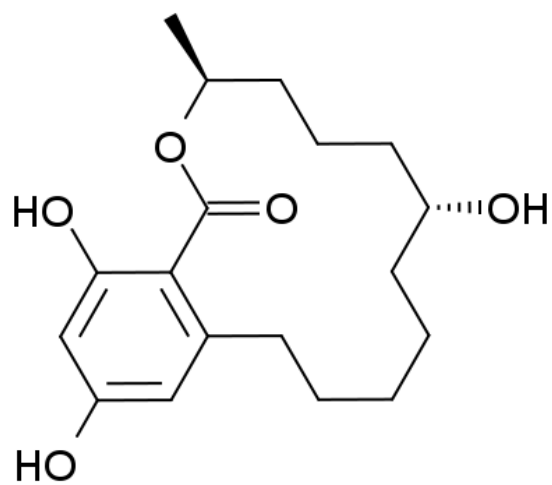


Figura 3. Struttura dello zeranolo

### 2.2.2 Androgeni

Gli androgeni sono prodotti dal testicolo, dall'ovaio e dalla corticale delle ghiandole surrenali. Come in altri tessuti steroidogenici, il colesterolo serve come substrato per la sintesi di pregnenolone nelle cellule di Leydig del testicolo.

L'androgeno naturale più importante è il testosterone (Figura 4). Oltre a questo composto, i testicoli producono anche altri ormoni, quali l'androstenedione e il deidroepiandrosterone, che possiedono comunque un potenziale androgenico molto basso.

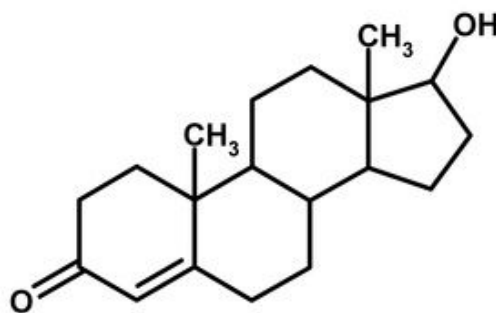


Figura 4. Struttura del testosterone

La secrezione di testosterone è regolata soprattutto da un asse ipotalamo-ipofisi-testicolo, oltre che da un circuito intratesticolare. La secrezione ipotalamica di GnRh determina liberazione ipofisaria di LH e FSH: la prima gonadotropina stimola le cellule di Leydig del testicolo a produrre testosterone, mentre la seconda induce la produzione da parte delle cellule del Sertoli di ABP (Androgen Binding Protein), che legandosi all'ormone, ne mantiene elevata la concentrazione nei tubuli seminiferi. Il testosterone, a sua volta, esercita un feed-back negativo sulla secrezione del GnRh ipotalamico, per cui, all'aumentare del testosterone, si determina inibizione dell'ipotalamo e dell'ulteriore ed eccessiva produzione di testosterone. Le manifestazioni del feed-back negativo si rilevano anche nel caso di somministrazioni esogene di testosterone, che provocano inibizione delle cellule di Leydig e sterilità temporanea. In caso di somministrazioni ripetute, la sterilità può divenire persistente, ed è questo l'effetto che

deriva dai casi di doping, come accertato anche in campo umano (Aguggini *et al.*, 1998).

Il testosterone, una volta secreto dalle cellule di Leydig del testicolo, entra direttamente nel sangue, dove si lega alla SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), una globulina specifica per gli ormoni sessuali. Il testosterone, essendo liposolubile, attraversa facilmente la membrana cellulare e penetra nel citoplasma, dove si lega ad un recettore proteico citoplasmatico. Tale complesso entra nel nucleo e si lega direttamente alla cromatina attivando una specifica espressione genica (Aguggini *et al.*, 1998).

A livello fisiologico gli androgeni intervengono nel mantenimento della spermatogenesi (agiscono sulla divisione meiotica e sulla differenziazione morfologica degli spermatozoi), nello sviluppo dei caratteri sessuali secondari, degli organi sessuali accessori e del comportamento sessuale. Inoltre, esercitano un'azione anabolica sul metabolismo proteico, determinando un aumento della crescita corporea (effetto anabolizzante) e un incremento di sviluppo e forza delle masse muscolari (Preziuso e Preziuso, 1999). Infatti, recettori per il testosterone sono presenti anche nelle cellule muscolari. A seconda della specie zootecnica e del gruppo muscolare, i livelli di espressione dei recettori per gli androgeni cambiano. Ad esempio, nei muscoli della testa, del collo, delle spalle e del dorso, la concentrazione dei recettori è maggiore, mentre è minore nei muscoli del torace e degli arti posteriori. Ciò significa che questi due gruppi muscolari rispondono in maniera diversa alla somministrazione di ormoni (Cini *et al.*, 2006).

Come già accennato in un altro paragrafo, vengono considerati anabolizzanti tutti quei composti che promuovono l'aumento del peso corporeo, incrementando sia l'efficienza di conversione dell'alimento che la ritenzione di azoto. Ciò significa che tali sostanze favoriscono la sintesi di proteine, diminuendone contemporaneamente la degradazione. Gli androgeni sono gli agenti anabolici per eccellenza, perché agiscono direttamente sul muscolo scheletrico che non può convertire il testosterone in diidrotestosterone. Inoltre, la loro azione non è mediata, come per gli estrogeni, da altri ormoni endogeni (Cini *et al.*, 2006).

Il testosterone viene somministrato come promotore della crescita generalmente insieme al 17 $\beta$ -estradiolo (Lone, 1997). Vengono utilizzati a tale scopo anche androgeni di sintesi; questi composti hanno la struttura base del testosterone e ad essa sono legati sia l'effetto anabolizzante (aumento della massa muscolare) che l'effetto androgeno (mascolinizzazione). Tra gli androgeni sintetici il trenbolone (Figura 5) è uno degli

agenti anabolizzanti più efficaci, poiché possiede un'attività ormonale multipla. Infatti, questo ormone dimostra un'elevata affinità per diversi tipi di recettori: per gli androgeni, per i progestinici e per i glicocorticoidi. La sua notevole attività come promotore della crescita è basata sia sull'attività anabolizzante, come androgeno, sia sull'attività anti-catabolica, come competitore dei glicocorticoidi, che vengono rilasciati dal corpo durante episodi di stress. Il trenbolone legandosi ai siti specifici per i glicocorticoidi, ne riduce gli effetti catabolici di cui sono dotati e di conseguenza inibisce la degradazione proteica (Meyer, 2001). Il trenbolone, di solito, è somministrato nella forma acetata come impianto sottocutaneo. Una volta impiantato alla base dell'orecchio viene velocemente idrolizzato a trenbolone e si distribuisce rapidamente nei vari distretti dell'organismo. L'escrezione avviene nelle urine o nelle feci dopo circolazione enteroepatica. (Lone, 1997).

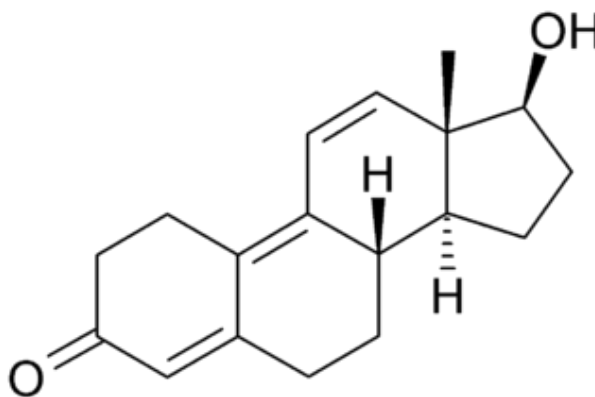


Figura 5. Struttura del trenbolone

### 2.2.3 Gestageni o Progestinici

In questa classe di composti il più importante è il progesterone (Figura 6), la cui sintesi avviene a partire dal colesterolo, e che segue le reazioni di biosintesi degli altri steroidi sessuali, dei quali è un precursore. Il progesterone si trova solo in piccola quantità in circolo, poiché viene rapidamente inattivato nel fegato per coniugazione con acido glucuronico (Aguggini *et al.*, 1998).



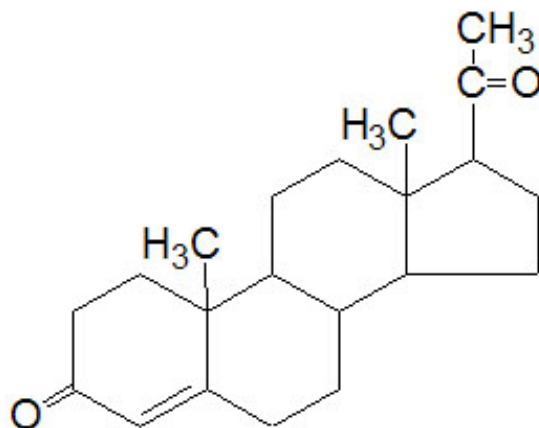


Figura 6. Struttura del progesterone

Come per gli altri ormoni sessuali, la secrezione di progesterone è regolata dall'ipotalamo e dall'ipofisi. In particolare, appare prevalente l'azione dell'LH, che è indispensabile per il mantenimento del corpo luteo e per la sintesi di progesterone. Il feed-back negativo che quest'ultimo esercita sulla secrezione ipotalamica di GnRh ha la funzione di impedire la maturazione di altri follicoli ovarici (Aguggini *et al.*, 1998).

In generale, il progesterone esplica azione di preparazione e mantenimento della gravidanza, intervenendo sui seguenti distretti fisiologici (Preziuso e Preziuso, 1999):

- Follicolo ovarico: stimola i processi di accrescimento follicolare;
- Utero: abbassa la contrattilità spontanea del miometrio e la sua sensibilità all'ossitocina, trasforma l'endometrio in mucosa secretoria, creando così le condizioni adatte per la capacitazione spermatica e per la sopravvivenza intrauterina degli embrioni fino al loro impianto (produzione di latte uterino). Inoltre, determina immunosoppressione temporanea, per evitare che il prodotto del concepimento venga riconosciuto come corpo estraneo, e induce la formazione del tappo mucoso cervicale;
- Mammella: esplica un'azione trofica (complementare a quella degli estrogeni), in particolare sulla parte alveolare;
- Comportamento: partecipa agli effetti indotti dal ciclo sessuale e durante la gravidanza induce un aumento della tranquillità del soggetto;

- **Metabolismo:** diminuisce la sensibilità all'insulina e il riassorbimento renale di sodio, con azione antagonista all'aldosterone. Inoltre promuove una maggiore efficienza nutrizionale, con un incremento ponderale in gravidanza.

I progestinici sono molto simili strutturalmente agli androgeni e possono interagire anche con i recettori androgenici. Inoltre, possono svolgere la loro azione attraverso l'induzione dell'incremento dei livelli del GH e dell'insulina.

In medicina veterinaria, tra i vari progestinici utilizzati, ci sono il progesterone, il melengesterol acetato (MGA) e il clormadinone acetato, che vengono solitamente utilizzati in associazione con estrogeni ed androgeni. Una somministrazione prolungata di progesterone può causare la formazione di tumori in quegli organi che sono stimolati dalla sua azione, quali ghiandola mammaria, ovaio, utero e vagina. L'MGA (Figura 7) presenta un'affinità di legame al recettore progestinico 5,3 volte maggiore rispetto al progesterone stesso e un'attività ormonale fino a 125 volte più alta. La somministrazione di MGA negli animali da allevamento provoca soprattutto l'incremento ponderale del soggetto, un miglioramento dell'efficienza di conversione dell'alimento, il blocco dell'ovulazione, la diminuzione dei livelli plasmatici di progesterone e l'inibizione dell'estro (Cini *et al.*, 2006).

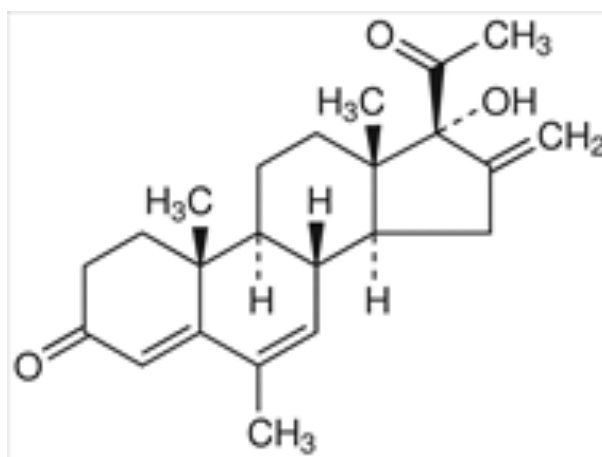


Figura 7. Struttura del melengestrolo acetato

#### 2.2.4 Effetti degli ormoni sessuali nei bovini

Gli anabolizzanti usati in modo illecito in zootecnia, oltre agli effetti perseguiti, quali lo sviluppo della massa muscolare e la diminuzione dei grassi di deposito, producono notevoli alterazioni a quegli organi che fisiologicamente sono stimolati positivamente o negativamente da queste sostanze. In particolar modo gli animali trattati sono soggetti a molteplici gravi disfunzioni quali (Biolatti *et al.*, 2003; Guarda *et al.*, 1988; Rosmini *et al.*, 1987):

- Alterazioni del comportamento: gli androgeni sono responsabili d'indurre stati di ipereccitazione, paura e aggressività, oltre ad aumento della libido (caratteristica anche degli estrogeni). Al contrario i progestinici rendono l'animale più mansueto, sottomesso e lento nei movimenti, con tendenza al decubito.
- Modificazione dei parametri zootecnici caratteristici della razza e alterazioni morfo-funzionali di alcuni organi ispezionabili alla visita clinica:
  - Maschi: notevole sviluppo della massa muscolare, ipotrofia dei testicoli, e aumento di volume della ghiandola mammaria e dei capezzoli;
  - Femmine: considerevole aumento della muscolatura (in particolare quella del collo e dei quarti anteriori), vulva gonfia, edematosa, con secrezioni vaginali, clitoride maggiormente sviluppato, inserzione "alta" della coda, e precocità di sviluppo della ghiandola mammaria nei soggetti impuberi, con capezzoli ingrossati, da cui può fuoriuscire una secrezione colostro simile.
- Alterazioni morfologiche e funzionali a carico di diversi organi interni, riscontrabili all'esame anatomo-patologico (macroscopico) oppure all'esame istologico: nei maschi sono i testicoli, la prostata e la ghiandola bulbo-uretrale mentre nelle femmine l'utero, la ghiandola mammaria, la ghiandola vestibolare maggiore (di Bartolino) e le ovaie.
  - Testicoli: è possibile rilevare una diminuzione delle dimensioni all'esame macroscopico e atrofia testicolare a quello istologico;
  - Prostata e ghiandole bulbo-uretrali: si possono riscontrare un aumento di volume sia del corpo che della parte disseminata della prostata, oltre ad un aspetto biancastro della superficie di taglio; anche le ghiandole bulbo-uretrali possono risultare di dimensioni aumentate. Il quadro

istopatologico dimostra in entrambi gli organi, nel caso di trattamento con sostanze estrogene la presenza d'iperplasia e metaplasia squamosa a carico sia dell'epitelio ghiandolare che tubulare, mentre gli androgeni, determinano primariamente dilatazione tubulare, ipersecrezione a livello ghiandolare e formazione di cisti o microcisti, associate o meno alle lesioni iperplastiche;

- Utero: aumentato di volume con possibile presenza di mucometra ed idrometra, caratterizzate da notevole raccolta di muco nel lume dell'organo, nel primo caso vischioso e di consistenza mucosa, mentre nel secondo più fluido e di aspetto simile al muco estrale;
- Ghiandola mammaria: nei soggetti impuberi trattati con sostanze estrogene e/o progestiniche la ghiandola è ingrossata, così come i capezzoli, dai quali può fuoriuscire del secreto. All'esame istologico si rileva uno sviluppo precoce del tessuto ghiandolare secernente (differenziazione), costituito da alveoli ripieni di secreto, attorno ai dotti e negli spazi prima occupati dal tessuto adiposo;
- Ghiandola di Bartolino: si può riscontrare in caso di trattamento con ormoni sessuali un aumento di volume, di consistenza e la presenza di macrocisti. All'esame istologico, così come nel caso delle ghiandole bulbo-uretrali maschili, delle quali rappresentano un analogo, nel caso in cui ai bovini siano state somministrate sostanze estrogene, sono evidenziabili iperplasia e metaplasia squamosa, sia dell'epitelio ghiandolare che tubulare. In particolare, la metaplasia grave rappresenterebbe una conseguenza del trattamento con estrogeni di sintesi, quali il DES, mentre nel caso di estrogeni naturali, o altre associazioni ormonali, le lesioni sarebbero riconducibili soltanto a lieve metaplasia e iperplasia. Gli androgeni provocano, invece, fenomeni di ipersecrezione, associati o meno alle lesioni iperplastiche, e conseguenti ectasie duttali, formazione di cavità cistiche e cisti intraepiteliali;
- Ovaie: nei soggetti impuberi si attivano aumentando di volume, diventano cistiche (microcisti, macrocisti) o atrofiche, oppure iniziano a ovulare come nei soggetti adulti. Inoltre, è possibile riscontrare delle piccole masse nodulari, in profondità, visibili solo al taglio, riconducibili a neoplasie.

### 2.2.5 Controlli sull'uso illecito degli ormoni sessuali

Per quanto riguarda le indagini ufficiali, condotte secondo le disposizioni del Piano Nazionale Residui, i campioni da sottoporre ad analisi per la ricerca di residui di ormoni sessuali sono (PNR 2013):

- Siero in allevamento nel caso degli ormoni naturali, ovvero 17 $\beta$ -estradiolo, testosterone e progesterone;
- Urina in allevamento e al macello per stilbeni (dietilstilbestrolo, diesestrolo, esestrolo), zeranolo e metaboliti, nortestosterone e boldenone;
- Urina in allevamento per metiltestosterone, trenbolone e metaboliti, e stanozololo;
- Muscolo al macello per gli estrogeni di sintesi (etinilestradiolo);
- Tessuto adiposo al macello per i gestageni.

L'eventuale somministrazione di ormoni sessuali può essere svelata mediante l'utilizzo di differenti metodiche di laboratorio. L'analisi del campione avviene con una tecnica iniziale detta di screening, che in questo caso, è rappresentata da test immunoenzimatici (ELISA) o radioimmunoenzimatici (RIA), mentre per la conferma di eventuali sospetti, vengono utilizzate la gas cromatografia (GC) o la cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa (MS).

L'applicazione di nuovi metodi analitici o il miglioramento delle prestazioni di quelli già in uso dovrebbe essere affiancato da un aumento delle informazioni riguardo sia l'assorbimento, la biotrasformazione e la cinetica di eliminazione degli ormoni illegalmente somministrati, sia i livelli fisiologici degli ormoni endogeni. Infatti, se nel caso degli steroidi sessuali di sintesi, naturalmente non presenti nell'organismo, per dimostrare un trattamento illecito è sufficiente confermare la presenza di queste sostanze o dei loro metaboliti, nel sangue, nei tessuti o negli escreti, per gli ormoni naturali, quali testosterone, 17 $\beta$ -estradiolo e progesterone (e per i loro metaboliti e precursori), che sono presenti fisiologicamente nell'organismo animale, risulta necessario stabilire dei limiti (valori soglia) per poter distinguere tra concentrazioni fisiologiche e quelle indicative di trattamenti illegali (Scippo *et al.*, 1993). Nel bovino i dati sui livelli "basali" degli ormoni naturali sono particolarmente difficili da ottenere, sia perché sono influenzati da numerosi fattori, quali ad esempio, l'alimentazione, la razza, il sesso, l'età o il ritmo circadiano, sia perché spesso i dati che si assume siano i

livelli fisiologici, provengono da un numero limitato di animali controllo oppure sono ricavati da analisi effettuate prima di un trattamento sperimentale o dopo un cospicuo periodo di tempo da esso, o addirittura, nella peggiore delle ipotesi, si assumono come livelli fisiologici i valori ottenuti dai piani di monitoraggio (Nielen *et al.*, 2007). La carenza di dati sui livelli fisiologici degli ormoni naturali rende nel bovino il controllo del loro uso particolarmente difficile. Infatti, i dati a disposizione indicano come nelle preparazioni illegali utilizzate come promotori della crescita, gli ormoni naturali siano diventati tra gli ingredienti più comuni appunto perché la loro somministrazione esogena non è facilmente dimostrabile (Courtheyn *et al.*, 2002). Nella maggior parte dei casi gli anabolizzanti sono somministrati ai bovini sotto forma di esteri (benzoato, propionato, palmitato, etc.) in soluzioni iniettabili a lento rilascio, come impianti sottocutanei o per via orale. Dopo idrolisi dell'estere, che avviene rapidamente già nel plasma, la forma libera segue il destino metabolico dei componenti naturali dell'organismo (Rico, 1983).

Attualmente, nel bovino il controllo dell'uso degli ormoni naturali prevede il monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche del 17 $\beta$ -estradiolo, del testosterone e del progesterone (D. M. 14/11/96) ma non contempla nessuna indagine delle concentrazioni urinarie di questi ormoni. Per il plasma sono state stabilite, considerando le differenze dovute al sesso e all'età, delle concentrazioni massime accettabili il cui superamento porta a sospettare una somministrazione esogena di tali sostanze (Tabella 1). Il presupposto che ha portato a stabilire tali limiti è che un eventuale trattamento con una delle sostanze sopra elencate, o con loro analoghi, dovrebbe causare un aumento delle concentrazioni plasmatiche rilevabili. Infatti, è stato evidenziato su un gruppo di vitelli a carne bianca che in caso di trattamento con testosterone e 17 $\beta$ -estradiolo, il livello plasmatico e urinario di quest'ultimo è maggiore rispetto agli animali di controllo, consentendo di stabilire un valore soglia al di sopra del quale si possa sospettare ci sia stato un trattamento illecito (Arts *et al.*, 1991). Questi risultati sono stati confermati, anche con protocolli di trattamento diversi, per il plasma da Simontacchi *et al.*, (2004), e sia per il plasma che per l'urina da Scippo *et al.* (1993).

I trattamenti con testosterone da solo o in combinazione con 17 $\beta$ -estradiolo non sembrano invece causare un incremento dei livelli plasmatici ed urinari di testosterone che risultano essere addirittura più bassi di quelli degli animali di controllo (Arts *et al.* 1991; Scippo *et al.*, 1993), ma poiché i dati disponibili sull'escrezione urinaria del testosterone nel bovino indicano che la concentrazione di questa molecola nell'urina

varia in un range molto ampio, non è stato possibile al momento stabilire un valore soglia di riferimento da applica

re alle analisi delle urine per identificare un trattamento. La situazione è ulteriormente complicata dal fatto che la categoria di bovini che si presume sia più frequentemente soggetta al trattamento con testosterone siano i vitelli a carne bianca, ovvero animali che non hanno ancora raggiunto la completa maturità sessuale, in cui il quadro ormonale cambia rapidamente nel corso del ciclo produttivo (Arts *et al.* 1991).

Tabella 1 - Livelli fisiologici massimi nel plasma o nel siero di sangue dei bovini espressi in ng/ml

Sesso/età	17 $\beta$ -estradiolo (libero, non coniugato)	Progesterone	Testosterone
Maschi fino a 6 mesi	0,040	1	10
Femmine fino a 6 mesi	0,040	1	0,5
Maschi oltre i 6 mesi	0,040	1,5	30
Femmine oltre i 6 mesi (non gravide)	0,040	14	0,5

### **2.2.6 Il problema dei residui di ormoni sessuali**

Come detto in precedenza, estrogeni, androgeni e progestinici, con meccanismi diversi, determinano un maggiore sviluppo della massa muscolare di un animale che quindi presenterà un accrescimento considerevole in un ristretto periodo di tempo. La somministrazione ripetuta di tali sostanze consente perciò di ottenere una maggiore quantità di carne per singola carcassa (effetto anabolizzante) e con un contenuto minore di grasso. Inoltre gli animali da ingrasso trattati, raggiungendo più in fretta il peso di macellazione, vengono allevati per un minor periodo di tempo con conseguente risparmio economico da parte dell'allevatore. Tale pratica illecita comporta tuttavia la presenza di residui in carni destinate al consumo umano e quindi la possibilità di effetti nocivi per la salute del consumatore.

L'impiego di ormoni steroidei e di sostanze ormono-simili come promotori di crescita nei bovini è praticato legalmente in vari Paesi extra-europei, dove la loro somministrazione avviene principalmente sotto forma di impianto auricolare sottocutaneo, che permette un rilascio lento e prolungato delle sostanze attive, usate singolarmente o in associazione tra loro, e che vengono rimossi poi al momento della macellazione. E' prevedibile che la concentrazione dei residui sia più alta vicino al sito di impianto e nei tessuti circostanti, quindi i pericoli per i consumatori possono essere ridotti evitando la zona dell'impianto ed escludendola dalle carcasse per la distribuzione alimentare. Il trattamento può avvenire anche per via orale grazie all'aggiunta degli anabolizzanti agli alimenti zootecnici consumati giornalmente. I problemi maggiori derivano dal fatto che queste sostanze, vengono spesso utilizzate illegalmente ed iniettate direttamente nel muscolo. In ogni caso, la somministrazione di queste sostanze può determinare la presenza dei loro residui nei prodotti di origine animale e, per quanto la loro tossicità per l'uomo sia tutt'ora oggetto di controversie scientifiche, sin dal 1981 con la direttiva 81/602/CEE, l'Unione Europea (UE) ha proibito l'utilizzo sugli animali d'allevamento di sostanze ormonali come promotori della crescita. Tra le sostanze proibite figurano il 17 $\beta$ -estradiolo, il testosterone, il progesterone, lo zeranolo, il trenbolone acetato ed il melengesterololo acetato. Questo divieto si estende a tutti i paesi membri e anche alle carni importate da altri stati. Gli strumenti legali utilizzati sono la Direttiva 96/22/CE (Cini *et al.*, 2006), emendata dalle Direttive 2003/74/CE e 2008/97/CE.



### **2.2.6.1 I potenziali effetti sulla salute umana per esposizione agli ormoni sessuali**

Dall'1 Gennaio 1995 è in vigore l'SPS Agreement (Sanitary and Phytosanitary Measures), un accordo sulle misure sanitarie e fitosanitarie realizzato nell'ambito del WTO (Organizzazione Mondiale del Commercio) che permette di scegliere il livello di protezione sanitaria in presenza di giustificazioni scientifiche. L'Europa ha scelto il livello zero di rischio aggiuntivo per la salute dell'uomo derivante da residui di ormoni, utilizzati a scopo anabolizzante, nella carne e nei prodotti derivati. Dopo l'attivazione dell'SPS Agreement, gli USA e il Canada hanno contestato formalmente presso il WTO la decisione Comunitaria di vietare l'importazione di carne e prodotti derivati di animali trattati con gli ormoni sopra citati, e per tale motivo l'Unione Europea è stata sanzionata. Pertanto, su richiesta della Commissione, il comitato scientifico per le misure veterinarie in relazione con la salute pubblica (CSMVSP) è stato incaricato di definire il rischio potenziale per la salute umana derivante dai residui di ormoni nella carne bovina ed i suoi derivati. Il parere espresso dal CSMVSP si può riassumere in tre principali conclusioni riportate nella Direttiva 2003/74/CE:

“Primo, in caso di assunzione di dosi eccessive di residui di ormoni e dei loro metaboliti, viste le proprietà intrinseche degli ormoni e alla luce delle risultanze epidemiologiche, si ravvisa un rischio per il consumatore, suffragato da prove più o meno conclusive per ciascuno dei sei ormoni esaminati; secondo, ai sei ormoni si possono attribuire effetti endocrini, sullo sviluppo, immunologici, neurobiologici, immunotossici, genotossici e cancerogeni; tra i gruppi più esposti al rischio, il più vulnerabile è costituito dai bambini in età prepuberale; terzo, viste le proprietà intrinseche degli ormoni e alla luce delle risultanze epidemiologiche, non è possibile determinare una dose giornaliera ammissibile (ADI) per alcuna delle sei sostanze esaminate, qualora siano somministrati ai bovini per stimolarne la crescita.”

In particolare per quanto riguarda il  $17\beta$ -estradiolo, il CSMVSP riconosce questo ormone come carcinogeno completo, ovvero è in grado sia di iniziare che di promuovere la formazione di un tumore, e che i dati disponibili non consentono di fare una valutazione quantitativa del rischio. Anche per gli altri cinque ormoni (testosterone, progesterone, trenbolone acetato, zeranolo e melengestrol acetato), il CSMVSP ritiene che i dati tossicologici ed epidemiologici disponibili non consentano di stimare quantitativamente i rischi per il consumatore. Posteriormente al parere del CSMVSP, emesso il 30 aprile 1999, il comitato per i medicinali veterinari (CVMP) ha constatato

che il 17 $\beta$ -estradiolo esplica un'azione cancerogena solo dopo un'esposizione prolungata ed a livelli decisamente superiori rispetto a quelli necessari per una risposta fisiologica (estrogenica). Queste informazioni aggiuntive sono state esaminate attentamente dal CSMVSP, che però il 3 maggio 2000 ha concluso che da esse non emergono dati tali da recare modifiche alle conclusioni precedentemente emesse. Inoltre, il parere espresso nel 1999 è stato confermato anche nel 2002, dopo che il CSMVSP lo aveva riesaminato alla luce di dati scientifici più recenti (Direttiva 2003/74/CE).

Nel documento redatto dal CSMVSP vengono prese in considerazione le potenziali conseguenze avverse sulla salute umana per l'eccesso di esposizione agli ormoni sessuali, che possiamo così riassumere ([http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out21\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out21_en.pdf); Cini *et al.*, 2006):

- Effetti sul sistema endocrino: dovuti al feed-back negativo esercitato dagli ormoni, quali arresto della spermatogenesi, oligospermia e azospermia nel maschio; interruzione del ciclo ovarico, blocco dell'ovulazione, disturbi mestruali e infertilità nella donna;
- Disturbi della crescita, dello sviluppo sessuale, e della pubertà: è riscontrabile un aumento della crescita ossea (superiore al 60%), in caso di somministrazione di basse dosi di estradiolo ai bambini di 30-40 kg. rispetto ai parametri fisiologici nei soggetti impuberi; inoltre, telarca, pubarca, ovaie policistiche, *ovarian hyperstimulation syndrome*;
- Effetti sul sistema immunitario:
  - Malattie autoimmuni: numerosi studi hanno messo in luce una relazione tra ormoni, in particolare estrogeni, e malattie autoimmuni (anche se mancano correlazioni epidemiologiche con il consumo di carne), quali il lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide e la tiroidite autoimmune. Infatti le donne sono quelle maggiormente colpite;
  - Malattie allergiche: il decorso di malattie allergiche, quali dermatite atopica e asma è influenzato dalla pubertà, dal periodo pre-mestruale e post-menopausa. Inoltre è stato notato che sia l'incidenza che la distribuzione geografica di questa classe di malattie è la stessa del cancro al seno e alla prostata (tumori ormone-dipendenti);
  - Immunodepressione: il progesterone, per evitare fenomeni di rigetto verso il prodotto del concepimento, inteso altrimenti dalle strutture

uterine come corpo estraneo, determina un moderato effetto immunosoppressivo generale nella donna gravida. Tale situazione può però promuovere l'insorgenza di infezioni particolari, tra cui quella da Cytomegalovirus.

- Rischi secondari: la somministrazione agli animali di trenbolone acetato e testosterone provoca un ritardo nell'eliminazione di farmaci veterinari, in particolare sulfamidici e antibiotici, con conseguente incremento del rischio della presenza di carni contenenti residui indesiderati;
- Effetti genotossici e carcinogenici: Nessun studio ha chiarito con certezza le conseguenze dell'uso di anabolizzanti negli animali da carne sull'insorgenza del cancro nell'uomo. Per affrontare questo argomento sono stati presi in considerazione l'epidemiologia descrittiva e l'epidemiologia eziologica, la prima studia la distribuzione e il comportamento di particolari tipi di tumore nelle popolazioni, la seconda il ruolo della dieta e degli ormoni nel determinismo del cancro. E' stato evidenziato, ad esempio, che l'incidenza di tumori ormone-dipendenti, come quello alla ghiandola mammaria e alla prostata, e altri, come quello al colon, è maggiore nel Nord America, dove, oltre al particolare stile di vita e alimentare, il consumo di carni di animali trattati con ormoni è la più alta nel mondo. Ad oggi non è però possibile né confermare né escludere la connessione tra incidenze elevate di tumori e alto consumo di carni di animali trattati con ormoni in Nord America.

La IARC (International Agency for research on cancer) ha classificato gli estrogeni nel gruppo 1 (sicuri cancerogeni per l'uomo), gli androgeni nel gruppo 2A (probabili cancerogeni per l'uomo), ed i progestinici nel gruppo 2B (possibili cancerogeni per l'uomo) (IARC, 1987). L'attività cancerogena del  $17\beta$ -estradiolo, è probabilmente collegata alla sua capacità di legarsi al DNA. La capacità di una sostanza di legarsi al DNA è espressa in termini di Indice di Legame Covalente o CBI (Covalent Binding Index), che per questo ormone risulta il più alto in assoluto, seguito da trenbolone acetato, testosterone e zeranolo. E' stata dimostrata nel ratto, una correlazione diretta tra questo indice e lo sviluppo di carcinoma epatico (Cini *et al.*, 2006). Inoltre, la somministrazione di  $17\beta$ -estradiolo nei topi aumenta l'incidenza di tumori mammari, ipofisari, uterini, cervicali, vaginali, testicolari, linfoidi e ossei. Di conseguenza la proprietà dei metaboliti degli estrogeni di danneggiare il DNA e

causare mutazioni, potrebbe indurre nell'uomo la formazione di tumori al seno, utero, ovaie, prostata, e probabilmente cervello (Cavalieri *et al.*, 1998). La carcinogenicità evidenziata per gli estrogeni è stata collegata a terapie protratte nel tempo a dosi relativamente elevate, mentre non ci sono dati relativi di effetti genotossici e cancerogeni conseguenti all'utilizzo di ormoni a basse dosi.

## 2.3 Corticosteroidi

I corticosteroidi sono ormoni di natura steroidea sintetizzati, a partire dal colesterolo, dalla corticale delle ghiandole surrenali e deputati al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo. A livello fisiologico questi composti vengono suddivisi in:

- Glicocorticoidi, che intervengono nel metabolismo dei carboidrati, proteine e lipidi ed esercitano attività antiinfiammatoria ed antiallergica
- Mineralcorticoidi, importanti per l'equilibrio idro-elettrolitico
- Ormoni sessuali

A livello metabolico i glicocorticoidi determinano un aumento della gluconeogenesi, del catabolismo proteico e della lipolisi. Inoltre inibiscono le reazioni di tipo immunitario e infiammatorio mediante la depressione della sintesi anticorpale, la riduzione del numero di linfociti ed eosinofili circolanti, e la stimolazione della lipocortina che reprime l'attività della fosfolipasi A2, enzima coinvolto nell'insorgenza del processo infiammatorio (Aguggini *et al.*, 1998). Agiscono anche a livello cardiovascolare determinando un incremento della forza di contrazione cardiaca, della pressione sanguigna e della perfusione tissutale (Greco e Stabenfeldt, 2002) mentre sul SNC sono in grado di aumentare l'eccitabilità neuronale producendo una condizione di euforia che si traduce in uno stato di generale benessere (Aguggini *et al.*, 1998). Gli effetti fisiologici dei mineralcorticoidi sono, invece, un aumento della ritenzione di sodio, cloro e acqua, a fronte di una maggiore escrezione di potassio, fosforo e cloro, con conseguente aumento della pressione arteriosa (Greco e Stabenfeldt, 2002). Gli ormoni sessuali secreti dalla corteccia surrenale sono prevalentemente androgeni, mentre gli estrogeni sono prodotti solo in piccole quantità (Preziuso e Preziuso, 1999).

### 2.3.1 Glicocorticoidi

Il principale ormone glicocorticoide è il cortisolo (Figura 8), sintetizzato in condizioni di stress o di ipoglicemia, sotto stimolazione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) secreto dall'adenoipofisi (Aguggini *et al.*, 1998).

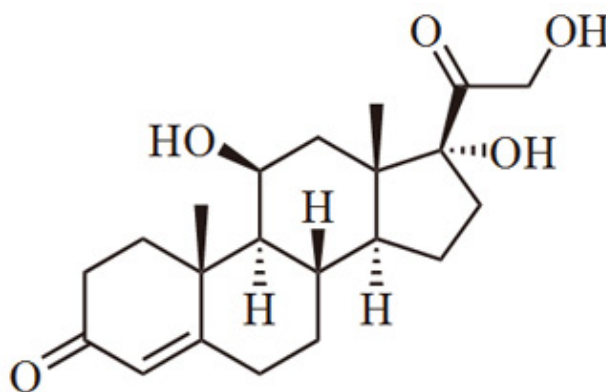


Figura 8. Struttura del cortisolo

Il meccanismo di azione di questi ormoni si esplica, come per la maggior parte degli ormoni steroidei, attraverso l'interazione con recettori specifici presenti a livello del citoplasma delle cellule bersaglio; a seguito di questo processo il complesso ormone-recettore può migrare nel nucleo, dove regola l'espressione genica grazie al legame con specifiche sequenze in grado di riconoscere tali complessi ovvero i Glucocorticoids Response Elements (GRE) (Ferguson e Hoenig, 1995).

Modificazioni della struttura del cortisolo estratto dalle ghiandole surrenali di vari animali hanno permesso di ottenere un grande numero di molecole di sintesi, utilizzabili dal punto di vista farmacologico e terapeutico in campo umano e veterinario.

Le indicazioni a scopo terapeutico dei glicocorticoidi sono molteplici e includono numerose patologie, sia metaboliche che infiammatorie, tanto nei piccoli quanto nei grandi animali.

Un corticosteroide di sintesi molto utilizzato in Medicina Veterinaria come anti-infiammatorio è il desametasone (DEX) (Figura 9), che, rispetto al cortisolo, ha un'azione più duratura e una potenza di circa 30 volte superiore, mentre è quasi privo del tutto di potere mineralcorticoide (Ferguson e Hoenig, 1995).

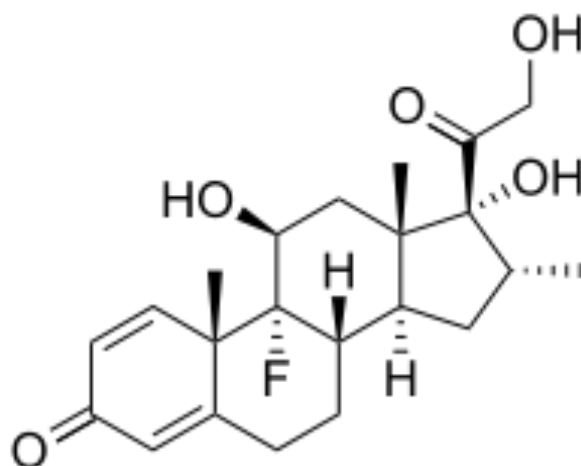


Figura 9. Struttura del desametasone

Per quanto riguarda il bovino, il DEX (soprattutto sodio-fosfato) viene largamente utilizzato per disordini muscolo-scheletrici, sindromi allergiche, chetosi primaria, shock ipovolemico, affezioni cutanee di varia natura e come induttore del parto nell'ultimo trimestre di gravidanza. Inoltre, viene spesso usato insieme ad antibiotici per ridurre la durata della sintomatologia clinica (Van de Hauwe *et al.*, 2003). La sua somministrazione per fini terapeutici avviene in genere per via intramuscolare (azione prolungata dovuta al lento rilascio di alcuni esteri) o endovenosa (maggiore rapidità d'azione, indispensabile, ad esempio, in caso di shock) (Girolami *et al.*, 2010).

L'uso terapeutico dei glicocorticoidi può, tuttavia, scatenare notevoli effetti collaterali, quali ipertensione, iperglicemia, glicosuria con conseguente poliuria e polidipsia, e rallentamento dei processi di cicatrizzazione per diminuita sintesi di collagene. La somministrazione ripetuta, inoltre, determina un aumento della suscettibilità alle infezioni per riduzione delle difese immunitarie e un eccessivo catabolismo proteico con conseguente atrofia muscolare (Anderson *et al.*, 1999), oltre ad un effetto teratogeno durante la gravidanza (Ferguson e Hoenig, 1995).

Ciò nonostante, il desametasone risulta uno dei cortisonici di sintesi maggiormente impiegati in modo illecito nell'allevamento del bovino da carne come promotore di crescita (Courtheyn *et al.*, 2002).

I dati che emergono dalle relazioni annuali del Ministero della Salute sui risultati dei controlli ufficiali, svolti in attuazione del Piano Nazionale Residui, dimostrano che, nella specie bovina, tra le sostanze ricercate per l'individuazione di trattamenti illeciti, la maggior parte delle non conformità è riconducibile all'uso di cortisonici. In particolare, nel 2007 sono stati riscontrati per i bovini 26 casi di positività a tali sostanze sul totale di 36 campioni non conformi, mentre l'anno seguente il numero è aumentato a 30 su 41 non conformità totali (PNR 2007; PNR 2008).

Infatti, alla luce della normativa vigente (D. Lgs 158/2006, modificato dal D. Lgs 148/2009), l'uso dei corticosteroidi in assenza di prescrizione e di registrazione nel registro dei trattamenti e dell'annotazione del Veterinario responsabile sul registro di scorta in caso di utilizzo è considerato "trattamento illecito".

Sebbene i glicocorticoidi di sintesi a dosi farmacologiche riducano la velocità di crescita e portino ad atrofia muscolare in seguito al catabolismo proteico, la loro somministrazione a bassi dosaggi e per lunghi periodi (3-6 settimane), *per os* o per via intramuscolare mediante preparazioni ritardo, influisce positivamente sull'accrescimento degli animali e sulla qualità della carne. Infatti, è stato dimostrato, attraverso numerosi studi sperimentali condotti su vitelloni e vitelli a carne bianca, che il desametasone, secondo tali protocolli di trattamento, è in grado di migliorare l'indice di conversione alimentare, la conformazione delle carcasse e di aumentare in modo moderato la massa muscolare (Corah *et al.*, 1995; Tarantola *et al.*, 2004; Gottardo *et al.*, 2008). In particolare, quest'ultimo effetto, rilevato a carico del muscolo *longissimus dorsi*, è stato messo in relazione con un aumento dei livelli plasmatici di insulina, che riduce il catabolismo proteico e favorisce la sintesi di nuove proteine attraverso l'incremento della captazione di amminoacidi (Corah *et al.*, 1995). Per quanto riguarda la conformazione della carcassa e le qualità organolettiche della carne è stato dimostrato anche che la somministrazione *per os* di basse dosi di DEX in vitelli a carne bianca determina un punteggio complessivo migliore in base alle classificazioni internazionali, nonché un colorito più pallido e una maggiore tenerezza, caratteristiche particolarmente apprezzate dal consumatore (Tarantola *et al.*, 2004).

I glicocorticoidi vengono utilizzati da soli o anche in associazione con altri promotori di crescita, quali  $\beta$ -agonisti o steroidi anabolizzanti, allo scopo di sfruttare gli effetti sinergici tra i diversi principi attivi. In particolare, il DEX è in grado di aumentare l'efficacia dei  $\beta$ -agonisti grazie alla capacità di neutralizzare la riduzione della



concentrazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici, indotta dal trattamento a dosi auxiniche con il clenbuterolo (Abraham *et al.*, 2004). Inoltre, i cortisonici sono in grado sia di potenziare l'effetto lipolitico sia di neutralizzare l'intensa glicogenolisi epatica e alcuni degli effetti negativi sul muscolo indotti dai  $\beta$ -agonisti, quali aumento della resistenza al taglio, diminuzione della sapidità e colorito scuro (Silvan *et al.*, 2007).

L'associazione dei glicocorticoidi con altri promotori di crescita trova giustificazione anche nella possibilità di eludere in parte le indagini degli organi di controllo. In tal senso, vengono sfruttate fraudolentemente sia l'attività antinfiammatoria dei glicocorticoidi, al fine di ridurre nel punto di inoculo le lesioni derivanti da ripetute somministrazioni di sostanze più o meno consentite (De Wasch *et al.*, 1998), sia la loro azione inibente sull'ormone antidiuretico (ADH), con conseguente poliuria e polidipsia, che a loro volta determinano una deplezione della concentrazione urinaria delle altre molecole somministrate a scopo illecito (Vincenti *et al.*, 2009).

Le alterazioni cliniche ed anatomo-patologiche derivanti dalla somministrazione prolungata di glicocorticoidi a basse dosi sono difficilmente evidenziabili. In allevamento è possibile riscontrare alterazioni del comportamento per l'effetto euforizzante ed anti-stress e segni di poliuria e polidipsia (rilevamento della lettiera bagnata). Dopo la macellazione dell'animale, all'esame *post-mortem*, è possibile rilevare una diminuzione di dimensioni delle ghiandole surrenali (Biolatti *et al.*, 2003), un incremento considerevole del grasso alla base del cuore e fenomeni degenerativi epatici (Guarda *et al.*, 1983). Tuttavia, l'organo maggiormente interessato è sicuramente il timo che si presenta atrofico e diminuito di peso, con un aumento della componente adiposa e connettivale. Tale riscontro è evidente soprattutto nei vitelli a carne bianca, nei quali, accanto a fenomeni atrofici, si possono rilevare segni di rigenerazione; nei vitelloni, invece, le alterazioni si evidenziano maggiormente all'esame istologico, con la presenza nella corticale del caratteristico pattern a "cielo stellato", per i numerosi linfociti apoptotici e fagocitati dai macrofagi che appaiono come tanti punti chiari su fondo scuro (Biolatti *et al.*, 2009). I lobuli timici, con la rarefazione dei linfociti, vengono infiltrati da cellule adipose (Rosmini *et al.*, 1987).

In uno studio sperimentale condotto su vitelli a carne bianca è stato dimostrato che, sia in caso di trattamento con dosaggio terapeutico (due somministrazioni per via intramuscolare di 15  $\mu\text{g/kg}$  a distanza di una settimana) che anabolizzante (0,4 mg al di per os per 23 giorni) di DEX, il timo va incontro ad una progressiva atrofia,

caratterizzata dalla sostituzione adiposa dei linfociti apoptotici, con una conseguente diminuzione dell'organo, soprattutto in rapporto al peso corporeo. Inoltre, è stato visto che, sebbene le alterazioni evidenziate non permettano di distinguere tra i due tipi di trattamento, l'atrofia timica regredisce rapidamente alla fine del periodo di somministrazione di DEX, e che l'organo manifesta una rigenerazione completa dopo 25 giorni dall'ultimo utilizzo sull'animale nel caso del trattamento terapeutico, mentre 11 giorni dopo nell'altro caso, compatibilmente con il tempo di attesa previsto per alcune tra le specialità medicinali più impiegate (Biolatti *et al.*, 2005).

La pratica illecita dei cortisonici negli animali ha delle ripercussioni negative sulla loro salute. Il trattamento con queste sostanze induce nei vitelli a carne bianca una serie di affezioni quali ulcere gastriche con emorragie e diarrea ematica, ritenzione di liquidi e squilibri metabolici. Tuttavia, la conseguenza più grave è la progressiva atrofia del timo, ghiandola fondamentale per la difesa immunitaria dell'organismo; la conseguente riduzione della sua funzionalità comporta una maggiore esposizione agli agenti patogeni delle malattie infettive che devono pertanto essere controllate con antibiotici e chemioterapici in dosi elevate. Alla macellazione i fegati di questi animali mostrano evidenti segni di patologie degenerative spesso molto gravi (Ferrero *et al.*, 1989).

Per quanto riguarda le indagini ufficiali, condotte secondo le disposizioni del Piano Nazionale Residui (PNR), le matrici da prelevare per la ricerca di residui di glicocorticoidi sono l'urina (in allevamento) e il fegato (al macello).

Per le analisi di screening, le metodiche impiegate sono quelle basate sui saggi immunoenzimatici, quali l'ELISA; per la conferma di eventuali sospetti si ricorre, invece, alla gas cromatografia (GC) o alla cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa (MS). L'analisi deve avvenire esclusivamente con metodi validati secondo quanto previsto dalla Decisione 2002/657/CE. La tecnica LC-MS/MS risulta la più adatta e potente allo scopo di identificare inequivocabilmente i corticosteroidi (Antignac *et al.*, 2005).

Nel caso del desametasone, studi tossicologici condotti nei ratti hanno evidenziato un NOEL (no observable effect level) di 1,5 µg/kg di peso corporeo, mentre dosi maggiori hanno portato all'induzione della tirosina aminotransferasi epatica (Schumacher *et al.*, 2003). Con una correzione di un fattore di sicurezza di 100 si è arrivati ad un intake giornaliero accettabile di 0,015 µg/kg di peso corporeo e quindi ai seguenti limiti massimi di residui (riportati nel Reg. CE 37/2010): 0,75 µg/kg nel muscolo dei bovini e

nel rene degli equidi, 2 µg/kg nel fegato di caprini e suini, 0,3 µg/kg nel latte di bovini e caprini. Queste concentrazioni possono essere presenti negli alimenti citati, perché ritenute prive di effetto tossico e considerate, sulla base di studi tossicologici e farmacologici, senza rischio per il consumatore. Negli Stati Uniti, la Food and Drug Administration non ha addirittura ritenuto possibile fissare degli appropriati LMR per il desametasone e un simile comportamento è stato adottato dagli analoghi organismi di controllo di Giappone e Canada; in tali Paesi vige, pertanto, la regola del c.d. “residuo zero” per tali cortisonici di sintesi (Attucci, 2011).

#### **2.3.1.1 Effetti tossici sull'uomo dei residui di glicocorticoidi negli alimenti**

I residui dei glicocorticoidi sintetici sono considerati pericolosi, tanto che nei Paesi dell'Unione Europea sono stati fissati valori estremamente bassi relativi alla dose giornaliera accettabile (DGA), pari a soli 0,9 µg totali (Girolami *et al.*, 2010). Considerata la potente azione farmacologica, l'uso illecito di questi composti rappresenta un serio rischio per la salute del consumatore, in seguito all'ingestione di organi edibili contenenti residui, in particolare del fegato e del latte. Possibili effetti tossici riguardano, ad esempio, l'azione immunodepressiva e le alterazioni del metabolismo glicidico (aumento della glicemia e resistenza all'insulina) (Nebbia, 2009); inoltre, l'azione luteolitica e il passaggio dei cortisonici e metaboliti attraverso la barriera placentare possono causare aborti, parti prematuri, insufficienza surrenalica dei neonati e ritardi nella crescita corporea e nello sviluppo dell'encefalo. Nel caso dell'esposizione attraverso il latte materno si possono verificare nel neonato una serie di effetti nocivi, quali diminuito accrescimento, alterazioni del metabolismo e turbe della mineralizzazione ossea (Nebbia, 2009).

## 2.4 $\beta$ -agonisti

I  $\beta$ -agonisti sono molecole di sintesi con struttura simile a quella delle catecolamine naturali, adrenalina e noradrenalina, e come queste ad azione adrenergico-stimolante. La struttura chimica dei  $\beta$ -agonisti è caratterizzata dalla presenza di un anello aromatico, di un gruppo ossidrilico sul carbonio  $\beta$ , di un atomo di azoto ionizzato nella catena laterale e di un sostituito legato allo stesso azoto, che conferisce specificità nei confronti del  $\beta$ -recettore. L'anello aromatico legato al carbonio  $\beta$  è essenziale per l'attività biologica del  $\beta$ -agonista (Smith *et al.*, 1998). Queste sostanze presentano un'elevata attività farmacologica, con azione sui recettori  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , il cui uso terapeutico è indicato nei casi di problemi respiratori (broncodilatatori), di minaccia di aborto o parto prematuro (tocolitici, determinando rilassamento della muscolatura uterina), e di problemi cardiaci (stimolatori della frequenza cardiaca). In quasi tutti i Paesi Europei, l'unico  $\beta$ -agonista raccomandato per uso terapeutico veterinario nel bestiame, nei cavalli e negli animali domestici, è il clenbuterolo (Figura 10) (Cini *et al.*, 2006).

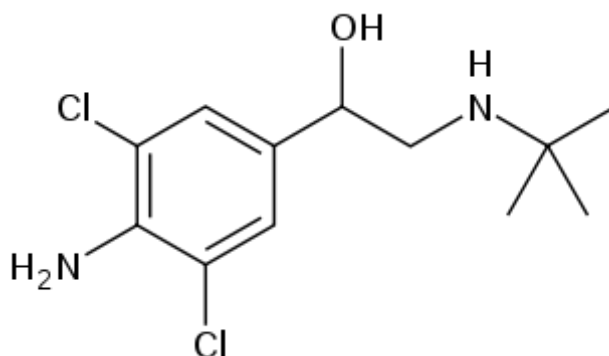


Figura 10. Struttura del clenbuterolo

La stimolazione del  $\beta$ -recettore adrenergico con un agonista specifico causa un cambiamento transitorio in cascata di tutte le componenti recettoriali che passano dallo stato di inattività a quello di attività: il complesso agonista-recettore stimola l'attivazione di una proteina G eterotrimerica associata alla molecola recettoriale, che a sua volta attiva l'adenilato-ciclasasi. Quest'ultimo, catalizza la conversione intracellulare dell'ATP in AMP-ciclico. L'accumulo intracellulare di AMP-ciclico comporta l'attivazione di protein-chinasi (PK) che, nel caso della muscolatura liscia bronchiale, riduce il grado di fosforilazione della catena leggera della miosina, con successiva

inibizione del legame calcio-dipendente actina-miosina e conseguente rilassamento dei tessuti (Smith, 1998).

E' autorizzato esclusivamente l'uso terapeutico dei  $\beta$ -agonisti, ma i vari vantaggi che offrono nel campo degli incrementi delle produzioni zootecniche ne hanno favorito ampiamente l'impiego illecito. I  $\beta$ -agonisti vengono somministrati per via orale con il mangime, determinando in breve tempo, un incremento di peso dell'animale, con aumento delle masse muscolari e diminuzione dei depositi adiposi. Poiché indirizzano l'energia proveniente dal metabolismo dei principi nutritivi verso un aumento delle sintesi proteiche muscolari, determinando allo stesso tempo uno spiccato effetto lipolitico, vengono anche indicati come "ripartitori di energia" (Fiems, 1987). I  $\beta$ -agonisti più idonei all'impiego illecito sono il clenbuterolo, il salbutamolo e la ractopamina, poiché è stata dimostrata la loro azione maggiormente selettiva sui recettori  $\beta_2$ . Infatti, mentre in organi come il cuore ed i reni prevalgono i recettori  $\beta_1$ , nei muscoli lisci e scheletrici, nel tessuto adiposo, nel fegato, nei vasi, nell'utero e nel pancreas, prevalgono i  $\beta_2$  (Ballarini, 1990; Boccuzzi, 1990; Lodetti, 1989).

La diminuzione del tessuto adiposo si osserva in tutte le specie ed interessa il grasso di copertura, quello interno e quello intramuscolare. Sembra che all'origine del fenomeno ci sia una maggiore spesa energetica da parte degli animali trattati con aumento della lipolisi e riduzione della lipogenesi. Inoltre, vi è una variazione nella composizione chimica del tessuto adiposo con aumento degli acidi grassi insaturi ed in particolare dell'acido linoleico (Lodetti, 1989). Sul piano metabolico i parametri serici rilevano un incremento statisticamente significativo dei NEFA (acidi grassi non esterificati) e del glicerolo, a dimostrazione di una stimolazione lipolitica, e una riduzione del glucosio e dei fosfolipidi (Cabassi, 1990). Si osservano modificazioni anche nei riguardi del metabolismo endocrino, in particolare dell'asse ipotalamo-ipofisario, con aumento della secrezione del GH, della prolattina, dell'ACTH e del TSH (Ballarini, 1990).

Lo sviluppo della muscolatura indotto dalla somministrazione dei  $\beta$ -agonisti è essenzialmente attribuibile all'ipertrofia, ovvero ad un aumento dei diametri delle miofibrille. Di fatto, studi sperimentali condotti con diversi  $\beta$ -agonisti somministrati nel mangime di varie specie animali hanno dimostrato un aumento della sintesi proteica, abbinato ad una diminuzione del catabolismo proteico. Le fibre muscolari maggiormente coinvolte sono quelle di tipo bianco a contrazione rapida piuttosto che quelle di tipo rosso: infatti sono più interessate le masse muscolari del quarto posteriore (Cabassi, 1990; Lodetti, 1989).

L'uso di  $\beta$ -agonisti incide non poco sulle caratteristiche organolettiche, igienico-sanitarie, dietetico-nutritive e tecnologiche della carne, a causa delle variazioni chimico-strutturali di grasso e muscolo. Ad esempio, l'aumento degli acidi grassi insaturi risulta controproducente per la conservazione della carne, perché più soggetta ai processi di ossidazione, mentre la diminuzione del grasso intramuscolare influenza negativamente la sua sapidità. Inoltre, la riduzione del grasso di copertura comporta un raffreddamento troppo rapido della carcassa, che può provocare *cold shortening* (contrattura da freddo) e una minor tenerezza della carne (Lodetti, 1989). La diminuzione del glicogeno muscolare determina un'insufficiente acidificazione delle carni, che raggiungono solamente pH di 6,2 (contro quello normale di 5,85), con conseguenti alterazioni nel processo del *rigor mortis*, della frollatura e della trasformazione del muscolo in carne. Quest'ultima si presenterà più dura e di colore scuro, molto simile a quella proveniente da animali stressati (carni DFD). Come se non bastasse, a pH maggiore saranno anche più rapidi i processi di alterazione microbica. Le carni risultano assolutamente inadatte alla produzione dei prosciutti e degli altri prodotti salumieri (Ballarini, 1990; Cabassi, 1990).

La somministrazione dei  $\beta$ -agonisti determina negli animali trattati alterazioni cliniche ed anatomo-patologiche che possono essere evidenziate in allevamento e al macello: aumento dell'eccitabilità, con tremori e crampi muscolari, eccessiva sudorazione, dispnea e atteggiamenti di fame d'aria. Alla visita ispettiva post-mortem è possibile riscontrare in caso di trattamento la scomparsa della cresta tracheale, dovuta al rilassamento della muscolatura liscia tracheale con aumento del diametro trasversale dell'organo, e riduzione del grasso sottocutaneo e perirenale (Biolatti *et al.*, 2003).

Studi sperimentali condotti su vitelli a carne bianca hanno dimostrato che la somministrazione cronica di clenbuterolo determina negli animali trattati anche la comparsa di enfisema polmonare, evidenziabile all'esame istologico. Inoltre, alcuni studi hanno mostrato che i soggetti manifestano incrementi ponderali giornalieri, indici di conversione alimentare e rese a caldo alla macellazione significativamente migliori rispetto agli animali controllo, mentre il peso della pelle e della testa sono statisticamente maggiori nei soggetti non trattati. Il trattamento induce anche un significativo aumento della concentrazione dei recettori per gli estrogeni, lungo tutto il tratto genitale, e per il progesterone, a livello delle corna uterine; tali modificazioni sono state associate a caratteristici reperti anatomo ed istopatologici (aumento delle secrezioni uterine e vaginali, lesioni ovariche e ghiandolari) che riflettono

un'alterazione dello stato endocrino dell'animale sottoposto a trattamento (Biolatti *et al.*, 1992; Re *et al.*, 1992).

Per la ricerca di residui di  $\beta$ -agonisti vengono prelevate in allevamento il pelo e l'urina, mentre al macello il fegato ed i bulbi oculari (accumulo del clenbuterolo nel tessuto epiteliale pigmentato della retina). Le metodiche impiegate sono, per le analisi di screening, il test ELISA o la cromatografia su strato sottile (TLC), mentre per la conferma di eventuali sospetti si ricorre invece alla gas cromatografia (GC) o alla cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa (MS). Il limite d'azione di tali sostanze è rappresentato dalla loro presenza nei campioni prelevati al macello o in allevamento (PNR 2013). Per quanto riguarda i limiti massimi di residui di clenbuterolo negli alimenti di origine animale, il Reg. CE 37/2010 ha fissato 0,1  $\mu\text{g/kg}$  e 0,05  $\mu\text{g/kg}$  rispettivamente nel muscolo e nel latte bovino, mentre 0,5  $\mu\text{g/kg}$  nel fegato e rene degli equidi. Queste concentrazioni sono riconosciute accettabili negli alimenti, perché non rappresentano un rischio tossicologico per la salute umana.

Gli effetti negativi del trattamento degli animali con i  $\beta$ -agonisti sono riconducibili all'attività simpaticomimetica di questi. Per dosaggi elevati e prolungati vengono a risentirne l'apparato respiratorio, l'apparato cardiocircolatorio, il sistema neuromuscolare e l'intero metabolismo. Negli animali trattati si osserva generalmente un aumento del metabolismo basale e di conseguenza un incremento della termogenesi, fino a raggiungere una ipertermia di 1 °C, non sempre seguito da un proporzionale consumo di cibo, in considerazione dell'effetto anoressico centrale svolto dalle sostanze  $\beta_2$ -adrenergiche (Cabassi, 1990; Lodetti, 1989).

L'effetto tossico principale riguarda il muscolo cardiaco che, a causa della caduta della pressione ematica, viene sovrastimolato con comparsa di tachicardia sino a 120 pulsazioni al minuto nel bovino, per lo più limitata alle prime 72 ore del trattamento (Lodetti, 1989). In caso di sovradosaggi e trattamenti prolungati, si possono osservare anche lesioni degenerative al miocardio. E' stato visto, infatti, che l'uso a fini farmacologici, in dosi opportune, di varie ammine simpaticomimetiche ha determinato lesioni necrotiche infarto-simili a carico del cuore. La patogenesi di tale cardiotoxicità sembra aggravarsi con l'età, la dieta scorretta e sotto l'influenza di alcuni ormoni come tiroxina, testosterone, estrone o per carenza di potassio o eccesso di sodio (Cabassi, 1990).

#### **2.4.1 Effetti sulla salute umana dei residui di $\beta$ -agonisti**

I residui nelle produzioni animali possono dare sintomatologia di tipo acuto nel consumatore che ha ingerito considerevoli quantità di residuo (tremori, tachicardia, cefalea, interferenza con il parto nella donna) o di tipo cronico, quali una possibile attività mutagena e/o cancerogena (Courtheyn *et al.*, 2002).

Sono stati descritti nella letteratura diversi casi di avvelenamento da clenbuterolo veicolato dal cibo. Ad esempio, in Spagna, tra l'ottobre 1989 e il luglio 1990, sono stati denunciati 135 casi di intossicazione in seguito ad ingestione di fegato di bovino e, ancora, 232 casi tra il gennaio e l'aprile 1992. Le persone colpite accusavano palpitazione, tachicardia, agitazione, tremori e mal di testa (Kuiper *et al.*, 1998; Page, 1998).

Nell'autunno del 1990 è stato descritto, in Francia, un caso di avvelenamento da cibo per residui di clenbuterolo in fegato di vitello. Furono colpite 22 persone appartenenti ad 8 famiglie. I sintomi comparvero da 1 a 3 ore dopo il consumo di fegato. In particolare, una donna con una precedente malattia cardiaca manifestò palpitazioni più marcate, mentre suo figlio no, nonostante avesse consumato la stessa pietanza. Ciò significa che le condizioni cardiache possono rendere una persona più suscettibile (Pulce *et al.*, 1991).

Il primo caso di intossicazione collettiva da  $\beta$ -agonisti ufficialmente denunciato in Italia, si è verificato nel febbraio 1995 in provincia di Vicenza, dove sette persone mostrarono a distanza di 2-3 ore dall'ingestione di bistecche, tachicardia, stato ansioso, parestesie e tremori agli arti (Barbarino, 1996).

Poco più di un anno dopo si verificò un caso di intossicazione da clenbuterolo nella provincia di Caserta, che dimostrò come ciò si possa verificare anche in seguito a consumo di carne diversa dal fegato. Infatti, il clenbuterolo fu ritrovato in elevata concentrazione nei campioni di muscolo. Probabilmente, in quel caso, si trattò di un animale trattato con una preparazione farmaceutica contenente clenbuterolo proveniente dal mercato nero: l'animale fu macellato e la carne venduta, clandestinamente (Brambilla *et al.*, 1997; Soprano *et al.*, 1998).

Un altro caso di intossicazione da clenbuterolo in Italia è stato dimostrato in un istituto per portatori di handicap ad Assisi, in seguito ad ingestione di carne di vitella. La sintomatologia era caratterizzata da tremore degli arti, palpitazioni, mal di testa ed eritema facciale (Brambilla *et al.*, 2000).



Casi di intossicazione acuta alimentare da clenbuterolo sono stati descritti anche in Portogallo, dove i 50 individui colpiti manifestarono immediatamente dopo l'ingestione di carne di agnello o bovina, diversi sintomi, quali tachicardia, tremore degli arti, nausea, dolori allo stomaco, diarrea, febbre, mialgia, astenia, ipertensione, vomito e vertigini (Barbosa *et al.*, 2005).

## 2.5 Tireostatici

I tireostatici sono sostanze ad azione antiormonale, che agiscono come inibitori degli ormoni secreti dalla tiroide, Tiroxina (T4) e Triiodiotironina (T3). Hanno una struttura molecolare relativamente semplice che comprende un gruppo sulfidrilico legato ad una catena tioureica. Questi composti, alcuni dei quali usati anche in medicina umana per combattere forme di iperfunzionalità della tiroide, vengono fraudolentemente impiegati in zootecnia per favorire l'incremento ponderale dei bovini (Ferrero *et al.*, 1989).

I farmaci ad azione tireostatica più frequentemente utilizzati illegalmente ai fini dell'ingrasso sono i derivati tiouracilici (tiouracile, metiltiouracile, propiltiouracile e feniltiouracile) e il tapazolo o metimazolo (Figura 11). Si tratta di composti a basso costo e facilmente accessibili sul "mercato nero", caratteristiche che, oltre alla loro potente attività, ne hanno favorito un largo impiego (Courtheyn *et al.*, 2002).

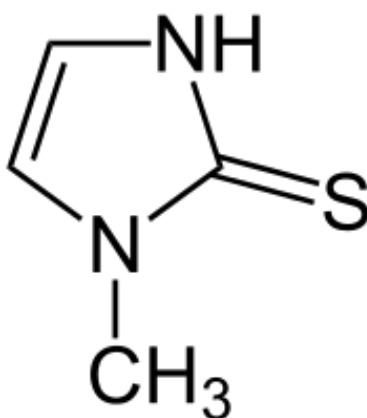


Figura 11. Struttura del metimazolo

Gli ormoni tiroidei T3 e T4 esercitano un ruolo fondamentale nell'accrescimento, nello sviluppo e nel controllo del metabolismo (stimolano la gliconeogenesi, la lipolisi e la produzione di calore). La loro sintesi dipende, oltre che da una regolazione autonoma della tiroide, da un meccanismo di feed-back ipotalamo-ipofisario (Aguggini *et al.*, 1998). In seguito al trattamento dell'animale con tireostatici, somministrati di solito con il mangime nelle ultime settimane prima della macellazione, la biosintesi degli ormoni tiroidei è inibita, con conseguente riduzione degli effetti attivatori del metabolismo, da questi esercitato. La ridotta produzione degli ormoni tiroidei determina, a sua volta, un incremento della secrezione dell'ormone tireotropo (TSH) da

parte dell'ipofisi, che ha un'azione trofica sulla tiroide ed è responsabile dell'aumento di volume di questa ghiandola (Catellani *et al.*, 1984). Nel soggetto trattato si instaura uno stato di ipotiroidismo che favorisce apparentemente la sua crescita, ma in realtà l'incremento di peso osservato è dovuto essenzialmente ad una ritenzione di acqua nei tessuti (carni "gonfiate"), ad una riduzione del metabolismo e ad una ridotta motilità gastro-intestinale (Palliola *et al.*, 1987). La ritenzione idrica tissutale, che arriva anche al 25%, è dovuta all'incremento della permeabilità capillare con passaggio di albumina nel tessuto interstiziale, ed è favorita dalla carenza dell'enzima ialuronidasi che si verifica per lo stato di ipotiroidismo indotto dai farmaci. Inoltre, i tireostatici provocano maggiore sintesi di una proteina idrofila, che si concentra nel tessuto interstiziale e si lega ai mucopolisaccaridi. Pertanto si ha un aumento del sistema gelificato interstiziale che causa il ristagno di fluidi, favorito anche da una contemporanea diminuzione del flusso plasmatico renale e della filtrazione renale, con conseguente oliguria ed edemi tissutali (Ferrero *et al.*, 1989). Infine, l'animale va incontro a coprostasi e urinostasi, che, insieme all'imbibizione idrica dei tessuti, comportano un aumento fraudolento del peso non accompagnato da un maggiore valore nutritivo (De Wasch, 2001).

La riduzione del metabolismo basale determina nell'animale trattato, bradicardia, ipotermia e problemi respiratori. Inoltre, l'accrescimento corporeo si riduce a causa del cessare della stimolazione da parte degli ormoni tiroidei; per tale motivo, i tireostatici sono somministrati solo ai bovini che hanno già raggiunto il peso utile per la macellazione (Ferrero *et al.*, 1989).

Il volume ed il peso della ghiandola tiroidea variano notevolmente da soggetto a soggetto e secondo la razza, l'età ed il sesso, ed anche con il modificarsi delle condizioni climatiche e stagionali. Nel vitello ha un colore che va dal bruno-grigiastro al bruno-scuro, mentre nell'adulto è di color bruno-rossastro chiaro. Il peso normale della tiroide nel vitello è compreso tra gli 11 e i 20 grammi, mentre nel vitellone tra i 20 e i 40 grammi. In seguito al trattamento, si può riscontrare all'esame post-mortem un aumento di volume e peso di questa ghiandola (Biolatti *et al.*, 2003).

La tiroide, istologicamente, presenta un parenchima costituito da follicoli, più o meno sferici, delimitati da un epitelio semplice, piatto o cubico. Le cavità follicolari sono ripiene di sostanza colloide, eosinofila, nella quale è contenuto il secreto ghiandolare. Le alterazioni istopatologiche che si possono evidenziare per il trattamento con tireostatici sono di tipo iperplastico e sono caratterizzate dalla proliferazione dell'epitelio follicolare con formazioni di aspetto papillare o a cuscinetto, in

associazione con la riduzione della sostanza colloide, che nei casi più gravi può anche scomparire. Pertanto l'aspetto generale dell'alterazione può essere riconducibile ad uno "struma iperplastico", che può aggravarsi sino allo "struma parenchimatoso", in cui il tessuto ghiandolare assume un aspetto compatto (Biolatti *et al.*, 2003).

Altri elementi da prendere in considerazione, per valutare un eventuale utilizzo illecito di queste sostanze, sono anche: l'edema diffuso, più o meno accentuato, di tutto il sottocute; il colio di liquido dai quarti quando sostano per un certo tempo appesi alle uncinaie; la perdita notevole di acqua nell'arrostimento della carne (Catellani, 1984).

Le matrici da prelevare per la ricerca di residui di tireostatici sono l'urina in allevamento e la tiroide al macello. La metodica di screening impiegata è la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), mentre per la conferma di eventuali sospetti si utilizza la gas cromatografia (GC) o la cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa (MS) (PNR, 2013).

La somministrazione di queste sostanze agli animali può provocare porpore, anemia, agranulocitosi, dermatiti e sonnolenza, mentre è stato dimostrato che il consumo di carne contenente residui di tireostatici e relativi metaboliti ha portato ad un aumento dei casi in Spagna di *aplasia cutis*, caratteristica malattia del cuoio capelluto. Inoltre, l'assoluto divieto all'uso di queste sostanze è motivato dalle forti evidenze dei loro effetti cancerogeni e teratogeni (Courtheyn *et al.*, 2002).

### **3. IL CONTROLLO DEI RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

#### **3.1 Il Piano Nazionale Residui**

Il nostro Paese è stato uno dei primi membri dell'Unione Europea ad affrontare il problema dei residui negli animali e nei prodotti da essi derivati. Risalgono, infatti, agli anni '60 i divieti riguardo la somministrazione di sostanze anabolizzanti negli animali da produzione: Legge n. 4 del 3 Febbraio 1961<sup>1</sup> e Decreto Ministeriale del 15 Gennaio 1969<sup>2</sup> (Galarini e Antonini, 2006).

Nell'allora Comunità Europea, la questione dei residui delle sostanze a scopo auxinico in zootecnia venne alla ribalta successivamente, nel 1981, con l'emanazione della Direttiva 81/602/CEE<sup>3</sup>, che vietava l'impiego negli animali d'allevamento di sostanze ad azione tireostatica, estrogena, androgena e gestagena, e l'immissione sul mercato di animali trattati con dette sostanze, nonché delle loro carni.

Fino a quel momento, le modalità di controllo degli animali e delle carni fresche per la ricerca di residui, la frequenza dei campionamenti sugli animali o sulle carni e le concentrazioni massime consentite erano disciplinate in maniera diversa negli Stati membri che applicavano la propria normativa nazionale. Ciò comportava, tra l'altro, considerevoli ostacoli agli scambi intracomunitari ed una distorsione delle condizioni di concorrenza tra produzioni. Il Consiglio della Comunità Europea, nella seconda metà degli anni '80, ritenne pertanto necessario trovare una soluzione globale e uniforme in merito ai controlli da effettuare per la ricerca di residui negli animali da allevamento, nelle carni e nei prodotti a base di carne, sia che questi prodotti fossero destinati al mercato nazionale o agli scambi intracomunitari (Galarini e Antonini, 2006). La Comunità Europea stabilì quindi, con l'emanazione della Direttiva 86/469/CEE<sup>4</sup>, che

---

<sup>1</sup> Legge 3 febbraio 1961, n. 4: "Divieto dell'impiego degli estrogeni come fattori di crescita o di neutralizzazione sessuale negli animali le cui carni e prodotti sono destinati all'alimentazione umana".

<sup>2</sup> Decreto Ministeriale de 15 gennaio 1969: "Divieto per gli allevatori di detenere o somministrare agli animali sostanze ad attività ormonale ed antiormonale".

<sup>3</sup> Direttiva 81/602/ CEE del Consiglio, del 31 luglio 1981, concernente il divieto di talune sostanze ad azione ormonica e delle sostanze ad azione tireostatica. G.U.C.E. 7 Agosto 1981 n. L 222. Recepita in Italia con il Decreto Ministeriale 3 novembre 1981: "Divieto di vendita di medicinali (specialità di medicinali o galenici) per uso veterinario contenenti stilbenici e tireostatici".

<sup>4</sup> Direttiva 86/469/CEE del Consiglio, del 16 settembre 1986, relativa alla ricerca di residui negli animali e nelle carni fresche.

ciascun Stato membro dovesse elaborare, tenendo conto della propria situazione specifica, un piano annuale di controllo, inteso a verificare l'impiego del farmaco veterinario, delle sostanze ad azione anabolizzante e la presenza dei contaminanti ambientali. Inoltre, tale Direttiva sanciva che i campionamenti fossero eseguiti in modo ufficiale secondo criteri comuni per le diverse categorie di sostanze interessate e che i campioni venissero analizzati in laboratori ufficialmente autorizzati. Qualora una determinazione analitica avesse rilevato la presenza di residui di sostanze non autorizzate o di sostanze consentite in quantità superiore al limite ammesso (campione non conforme), si imponeva l'adozione di misure comuni indirizzate ad accertarne la causa, ad eliminare il problema, ed atte ad assicurare che i prodotti coinvolti fossero effettivamente esclusi dal consumo.

E' così, che In Italia, a partire dal 1988, il Ministero della Salute predispone annualmente il "Piano Nazionale per la ricerca dei Residui (PNR)", che ha subito negli anni modifiche derivanti dalla necessità di adeguamento alle nuove problematiche, nell'ambito dei residui, che via via si sono presentate (ad esempio l'introduzione della ricerca di diossine, dei metaboliti dei nitrofuranici o di alcune molecole ad azione gestagena). Tale programma di sorveglianza e di monitoraggio, è finalizzato alla ricerca di residui di sostanze chimiche potenzialmente dannose per la salute pubblica, negli animali e negli alimenti che da essi derivano (Guidi, 2009).

Nel 1996 furono emanate due importanti Direttive Europee (96/22/CE<sup>5</sup> e 96/23/CE<sup>6</sup>), che disciplinano ancora oggi i piani nazionali per il controllo dei residui. Queste due Direttive furono recepite nell'ordinamento nazionale solo qualche anno più tardi con il D. Lgs 336/1999<sup>7</sup>. Mentre la prima estende il divieto d'utilizzazione nelle produzioni animali, oltre che ad alcune sostanze ad azione ormonica e tireostatica, anche ai  $\beta$ -

---

<sup>5</sup> Direttiva 96/22/CE del Consiglio del 29 aprile 1996: "concernente il divieto d'utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze  $\beta$ -agoniste nelle produzioni animali e che abroga le direttive 81/602/CEE, 88/146/CEE e 88/299/CEE". (GU L 125 del 23.5.1996, pag. 3). Modificata dalle Direttive 2003/74/CE e 2008/97/CE.

<sup>6</sup> Direttiva 96/23/CE del Consiglio del 29 aprile 1996: "concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE". (GU L 125 del 23.5.1996, pag. 10)

<sup>7</sup> Decreto Legislativo n. 336 del 4 agosto 1999: "Attuazione delle direttive 96/22/CE e 96/23/CE concernenti il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni di animali e le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti". G.U.C.E. 30 Settembre n. L 230.

agonisti, la seconda detta controlli e sanzioni più severe sull'uso illegale di suddette sostanze e sui loro residui (Cini *et al.*, 2006). Secondo la Direttiva 96/23/CE, per residuo si intende “il residuo di sostanze ad azione farmacologica, di loro prodotti di trasformazione, nonché di altre sostanze che si trasmettono ai prodotti animali e che possono essere nocivi per la salute umana”.

In particolare, con l'attuazione del PNR a livello della produzione primaria e nelle prime fasi di trasformazione dei prodotti di origine animale, si mira a svelare i casi di somministrazione illecita di sostanze vietate e la somministrazione abusiva di quelle autorizzate; inoltre, si verifica il rispetto dei limiti massimi di residui (LMR) di farmaci veterinari, fissati nell'allegato del Reg. CE 37/2010<sup>8</sup>, e delle quantità massime di antiparassitari e contaminanti ambientali fissate dalla normativa comunitaria e nazionale (PNR 2013). Per limite massimo di residui si intende, ai sensi del Reg. CE 470/2009<sup>9</sup>, “la concentrazione massima del residuo di una sostanza farmacologicamente attiva che può essere autorizzata negli alimenti di origine animale”.

Ad oggi, il PNR viene attuato ai sensi del D. Lgs. 158/2006<sup>10</sup> (che ha abrogato il D.Lgs 336/1999 e la Legge 4/1961). Tale decreto, modificato dal D. Lgs 148/2009, riporta nell'Allegato I, l'elenco delle sostanze da ricercare suddivise in due categorie distinte. Alla Categoria A appartengono tutte quelle sostanze con effetto anabolizzante e quelle non autorizzate per il trattamento degli animali da reddito; la Categoria B invece, comprende i medicinali veterinari autorizzati e i contaminanti ambientali, come i metalli pesanti e i composti organoclorurati.

---

<sup>8</sup> Regolamento (UE) n. 37/2010 della Commissione del 22 dicembre 2009: “concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale”.

<sup>9</sup> Regolamento (CE) n. 470/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009 che stabilisce procedure comunitarie per la determinazione di limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale, abroga il regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio e modifica la direttiva 2001/82/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 726/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio.

<sup>10</sup> Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n. 158: "Attuazione della direttiva 2003/74/CE, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali". Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 98 del 28 aprile 2006.

Allegato I, D. Lgs. 158/2006

Categoria A – Sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate

- 1) Stilbeni, loro derivati e loro sali ed esteri
- 2) Agenti antitiroidei
- 3) Steroidi
- 4) Lattoni dell'acido resorcilico (compreso lo zeranolo)
- 5)  $\beta$ -agonisti
- 6) Sostanze incluse nell'All. IV del Regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio, del 26 giugno 1990

Categoria B – Medicinali veterinari\* e agenti contaminanti

- 1) Sostanze antibatteriche, compresi sulfamidici e chinoloni
- 2) Altri prodotti medicinali veterinari
  - a) antelmintici
  - b) coccidiostatici, compresi i nitroimidazoli
  - c) carbammati e piretroidi
  - d) tranquillanti
  - e) antinfiammatori non steroidei (AINS)
  - f) altre sostanze esercitanti un'attività farmacologica
- 3) Altre sostanze e agenti contaminanti per l'ambiente
  - a) composti organoclorurati, compresi i PCB
  - b) composti organofosforati
  - c) elementi chimici
  - d) micotossine
  - e) coloranti
  - f) altri

\*Comprese le sostanze non registrate utilizzabili ai fini veterinari.

Fino al 2011 i cortisonici venivano inseriti nella Categoria A delle “Sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate” (in particolare nel gruppo A3 degli Steroidi). Su esplicita richiesta della Commissione Europea, dall'anno seguente queste sostanze sono passate nella Categoria B dei “Medicinali veterinari e agenti contaminanti” e nello specifico vengono inseriti in “Altri prodotti medicinali veterinari” alla voce “Altre sostanze esercitanti un'attività farmacologica” (B2f) (PNR, 2012).



Il Ministero della Salute – Direzione Generale per l’Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione rappresenta l’Autorità competente preposta alla stesura del piano. In collaborazione con Regioni e Province Autonome, Laboratori Nazionali di Riferimento per i residui e Istituti Zooprofilattici Sperimentali, l’Autorità competente elabora annualmente il PNR tenendo in considerazione i risultati dell’anno precedente, al fine di adottare eventuali variazioni mirate a migliorare l’efficacia del programma di sorveglianza e monitoraggio (PNR 2013).

Il PNR viene attuato esclusivamente nelle fasi di produzione primaria e di prima trasformazione dei prodotti di origine animale. La ricerca di residui di sostanze chimiche viene effettuata in allevamenti e macelli di bovini, suini, ovi-caprini, equini, volatili da cortile e conigli, nonché nelle attività primarie e di prima trasformazione riguardanti l’acquacoltura, la selvaggina, il latte, le uova e il miele.

Il PNR di ciascun anno ha inizio il 1° gennaio e termina il 31° dicembre: in questo arco di tempo le Aziende Unità Sanitarie Locali (AUSL) provvedono ad effettuare i campionamenti secondo le indicazioni ricevute da ciascun Assessorato alla Sanità delle Regioni e delle Province Autonome di Trento e Bolzano che, ricevuto il PNR inviato dal Ministero della Salute, pianificano le attività sul loro territorio di competenza in base all’attività produttiva e al patrimonio zootecnico presente (PNR 2013).

Sul piano del controllo ufficiale viene sistematicamente effettuato il prelievo di tessuti e di materiale biologico per le indagini chimiche quali-quantitative. Tuttavia, in tempi recenti, è stato preso in considerazione per i bovini l’esame anatomo-istopatologico, quale metodo di screening, in grado di rilevare le gravi lesioni a carico degli organi bersaglio, che permangono per un tempo abbastanza lungo da poter essere svelate al momento della macellazione, ed evidenziare l’impiego illecito di promotori di crescita, pur non permettendo di identificare la singola molecola coinvolta (Biolatti *et al.*, 2003). D’altronde, le indagini chimiche quantitative non sembrano rappresentare sufficientemente la realtà. Ciò è dovuto allo sviluppo di nuove strategie di trattamento per eludere i controlli, quali l’uso di combinazioni di diversi composti (*cocktails*), a bassissime dosi, ad azione analoga o sinergica (consentono di ottenere importanti risultati zootecnici, diminuendo la concentrazione relativa di ogni singola molecola, e, di conseguenza, anche quella di eventuali residui), l’utilizzo di sostanze che vanno incontro ad una rapida metabolizzazione ed eliminazione, e l’uso di molecole diverse o comunque modificate rispetto a quelle che vengono ricercate nelle analisi ufficiali (Biolatti *et al.*, 2003).

In uno studio condotto nei vitelli da carne riguardo alla valutazione delle performance del metodo istologico, per l'individuazione delle lesioni microscopiche indotte dal 17 $\beta$ -estradiolo nelle ghiandole sessuali accessorie, è stato dimostrato che l'analisi istologica è in grado di evidenziare il trattamento anche dopo quindici giorni di sospensione, quando i metodi chimici applicati sul siero non sono più in grado di riscontrare né la molecola, né i suoi metaboliti (Bozzetta *et al.*, 2010).

### **3.1.1 L'esame istologico**

L'esame istologico è stato così introdotto nel Piano Nazionale per la ricerca dei Residui a partire dal 2008, con l'inserimento del "Piano di monitoraggio mediante test istologico". Tale attività, da eseguire su bovini regolarmente macellati, viene attuata con lo scopo di realizzare in tutto il territorio nazionale un piano di sorveglianza epidemiologica (monitoraggio), circa l'utilizzo di sostanze non autorizzate o utilizzate impropriamente nell'allevamento bovino (PNR 2008).

Il Ministero, nella premessa del piano di monitoraggio mediante il test istologico, precisa però che esso deve essere considerato un elemento integrativo e non sostituisce, in alcun modo, il controllo chimico-fisico, che rimane l'unico metodo con validità giuridico-legale (PNR 2008).

In merito al campionamento, il Piano Nazionale Residui di quest'anno fornisce precise indicazioni riguardo al numero di partite da testare per Regione o Provincia autonoma (Tabella 2). Inoltre, devono essere preferite le partite di provenienza intra-regionale, evitando che la loro scelta sia dettata da valutazioni anamnestiche, come le caratteristiche degli animali macellati e precedenti positività dell'azienda di origine, e la loro distribuzione deve essere uniforme durante l'anno di attuazione del PNR (PNR 2013).

Tabella 2 - Numero di partite da campionare per singola Regione e Provincia Autonoma (PNR, 2013)

Partite inviate al macello /anno	Partite da controllare
N	n
41-50	22
51-60	24
61-80	26
>80	27

In sede di macellazione, i soggetti vengono scelti tenendo conto che l'unità di campionamento, da selezionare in modo del tutto causale, è rappresentata dalla singola partita, ovvero da un gruppo di animali della stessa categoria di età (bovini fino a 8 mesi oppure tra i 9 e i 24 mesi), provenienti dallo stesso allevamento, e inviati contemporaneamente ad un impianto di macellazione. Il veterinario incaricato del prelievo, in base alle dimensioni della partita prescelta, individua il numero di capi da esaminare per partita (Tabella 3).

Tabella 3 - Numero di capi da campionare per partita (PNR, 2013)

Dimensione della partita	Dimensione del campione
N	n
1-3	Tutti i soggetti
4-7	4
8-32	6
33 e +	7

Una volta determinato il numero di soggetti da campionare per una determinata partita, si procede, mediante campionamento di tipo sistematico in modo da escludere qualsiasi valutazione soggettiva, al prelievo dei campioni che vengono fissati in formalina al 10% per almeno 24 ore, utilizzando, possibilmente, contenitori da 25 cc a chiusura ermetica. Il prelievo dei campioni viene considerato idoneo quando, per ciascun animale della partita, vengono prelevati tutti gli organi previsti dal piano: fino al 2011, per entrambi i sessi, venivano prelevati timo e tiroide; per i maschi, inoltre, prostata e ghiandole bulbo uretrali, e per le femmine ovaio, mammella e ghiandole del Bartolino. Dal 2012, è stato

deciso di escludere dal campionamento i soggetti femminili, per mancanza di dati oggettivi necessari per la valutazione microscopica (PNR 2013).

La preparazione del campione per le analisi prevede, oltre alla fissazione in formalina da effettuarsi al momento del prelievo, l'inclusione in paraffina, il sezionamento al microtomo (spessore di 2/4 micron) e la colorazione con ematossilina-eosina. Dopodiché, il personale del laboratorio, debitamente formato, esegue la lettura dei vetrini ottenuti.

Per la registrazione delle alterazioni e per esprimere un giudizio sintetico, è previsto l'uso dell'apposita "Scheda diagnostica" e della "Scheda di valutazione" presenti nel PNR. La prima viene utilizzata nel corso della lettura del preparato con l'intento di specificare per ciascun organo indicato dal piano (PNR 2013):

- la non eseguibilità dell'analisi per campione non pervenuto, partita non conforme o età dell'animale non idonea per le analisi;
- la non idoneità del campione per porzione anatomica errata, autolisi, congelamento o, in caso di tessuto ghiandolare, presenza di flogosi di tipo follicolare imponente;
- l'età del bovino campionato (bovino fino a 8 mesi o da 9 a 24 mesi);
- il grado di atrofia indotta da corticosteroidi per il timo, mentre per la tiroide la presenza o meno di iperplasia diffusa da tireostatici, con l'esito conclusivo per entrambi gli organi (non sospetto/sospetto; nel caso di atrofia timica moderata e quindi campione dubbio, l'esito conclusivo sarà, sospetto per il bovino fino a 8 mesi e non sospetto per quello tra 9 e 24 mesi, in quanto tale organo va incontro con il tempo ad un'involuzione fisiologica).
- la presenza di metaplasia o meno nel tessuto ghiandolare di prostata e ghiandole bulbo uretrali, entrambi indagati per alterazioni dovute ad ormoni sessuali, e nei dotti per le sole ghiandole bulbo uretrali, con l'esito conclusivo per entrambi gli organi (non sospetto/sospetto).

La scheda di valutazione individua, per ciascun organo, la lesione da ricercare, il suo grado e l'esito finale (negativo, dubbio o sospetto), in base all'età dell'animale da cui è stato effettuato il prelievo (VCB=vitello a carne bianca, fino a 8 mesi; VTN=vitellone, da 9 a 24 mesi) (Tabella 4).

Tabella 4 - Scheda di valutazione (PNR 2013)

Timo		
Lesione	Esito	Esito
Atrofia	VCB	VTN
Assente/Lieve	Negativo	Negativo
Moderata	Sospetto	Dubbio
Grave	Sospetto	Sospetto

Tiroide	
Lesione	Esito
Iperplasia diffusa	
Assente	Negativo
Presente	Sospetto

Prostata - Tessuto Ghiandolare	
Lesione	Esito
Normale/Iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

Ghiandole Bulbo uretrali - Dotti	
Lesione	Esito
Normale/Iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

Ghiandole Bulbo uretrali – Tessuto Ghiandolare	
Lesione	Esito
Normale/Iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

Il laboratorio ha poi il compito di notificare gli esiti analitici alle AUSL e alle Regioni che hanno eseguito il prelievo.

E' stato stabilito, tenuto conto dei risultati ottenuti nel triennio 2010-2012, che la percentuale di partite potenzialmente oggetto di trattamenti illeciti deve essere inferiore alla soglia minima, fissata al 25%, mentre per la sensibilità, la specificità, il livello di confidenza e la potenza statistica è stata fissata una percentuale pari al 95%. Inoltre, una partita è considerata trattata, quando la prevalenza di lesioni coinvolge almeno l'80% dei capi che la costituiscono, indipendentemente dal loro numero.

Nella tabella seguente, viene indicato il numero massimo di capi, con lesioni evidenti, oltre il quale tutta la partita è da considerarsi sospetta, sebbene anche un singolo capo sospetto determini l'attivazione delle procedure da adottare a seguito di casi sospetti.

Tabella 5 - Numero di capi sospetti compatibili con un livello di prevalenza inferiore all'80% (soglia cut-off). In caso il numero di capi sospetti sia superiore a quello riportato in tabella, la partita è da considerarsi sospetta.

Dimensione del campione	Numero di sospetti al di sopra dei quali la partita è da considerarsi sospetta
N	N
1	0
2	1
3	1
4	2
6	3
7	4

Come detto in precedenza, il test istologico costituisce un utile metodo integrativo a sostegno del controllo ufficiale, non dotato però di valenza ai fini legali. Per tale motivo, le procedure da adottare a seguito di casi sospetti al test istologico, vanno attentamente valutate (PNR 2013).

### 3.2 Legislazione vigente

Il D. Lgs 158/2006 (attuazione della Direttiva 2003/74/CE), entrato in vigore nell'aprile dello stesso anno, ha abrogato il precedente D. Lgs 336/1999, che regolamentava il divieto di utilizzo di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze  $\beta$ -agoniste nelle produzioni animali ed indicava le misure di controllo da adottare negli animali vivi e nei loro prodotti, nonché la Legge 4/1961. Le più importanti disposizioni del Decreto riguardo all'uso di sostanze ad azione anabolizzante sono (D. Lgs. 158/06):

- Divieto di immissione sul mercato e somministrazione: il D.Lgs 158/2006 ribadisce l'assoluto divieto di immissione sul mercato di tireostatici, stilbeni e loro derivati, sali ed esteri, ai fini della loro somministrazione a tutte le specie animali. Inoltre, stabilisce che è vietato immettere sul mercato ai fini del loro impiego negli animali, le cui carni e prodotti siano destinati al consumo umano,  $17\beta$ -estradiolo e suoi derivati sotto forma di esteri, nonché sostanze  $\beta$ -agoniste (art. 2). L'art. 3 dispone il divieto di somministrazione ad animali di allevamento e di acquacoltura delle sostanze sopra indicate e di quelle ad azione estrogena, androgena e gestagena, nonché la loro detenzione nelle aziende di tali animali e l'immissione sul mercato per il consumo umano di carni e prodotti trasformati provenienti da animali a cui siano state somministrate le suddette sostanze.
- Deroghe al divieto di somministrazione: tuttavia l'art. 4 prevede alcune deroghe rispetto al divieto generale di cui agli artt. 2 e 3. Infatti, è concesso somministrare a singoli animali di un'azienda medicinali veterinari contenenti testosterone, progesterone o derivati che si trasformano facilmente per idrolisi nel composto iniziale. La somministrazione può essere effettuata esclusivamente da un veterinario mediante iniezione o, nel caso del trattamento di una disfunzione ovarica, attraverso una spirale vaginale, ma non mediante impianti. Inoltre, possono essere utilizzate sostanze  $\beta$ -agoniste ovvero trenbolone allilico per via orale negli equidi o negli animali da compagnia. Le sostanze  $\beta$ -agoniste possono anche essere impiegate nelle vacche al momento del parto sotto forma di un'iniezione per l'induzione della tocolisi. Tra i medicinali veterinari che includono steroidi sessuali possono essere utilizzati anche quelli contenenti  $17\beta$ -estradiolo e suoi derivati sotto forma di esteri per la cura negli animali di specie bovina della piometra, della macerazione o della mummificazione fetale. Mentre

il trattamento degli equidi e degli animali da compagnia con le sostanze  $\beta$ -agoniste è sufficiente che avvenga sotto la diretta responsabilità del veterinario (può, infatti, essere eseguito anche dal detentore sotto la responsabilità del veterinario), negli altri casi, lo stesso deve essere effettuato direttamente dal veterinario medesimo. Va comunque detto che il trattamento terapeutico con le sostanze sopra indicate non è consentito negli animali destinati alla produzione di carne e latte, nonché in quelli da riproduzione a fine carriera, ad eccezione dell'uso di sostanze  $\beta$ -agoniste nelle vacche al momento del parto.

L'art. 5 disciplina, invece, il trattamento zootecnico: ovvero è permesso l'impiego su animali chiaramente identificati di medicinali veterinari che contengono estrogeni (eccetto  $17\beta$ -estradiolo e suoi derivati sotto forma di esteri), androgeni o gestageni, purché tale trattamento sia effettuato da un veterinario. Inoltre è consentito somministrare farmaci che includono sostanze androgene negli avanotti d'acquacoltura a scopo di inversione sessuale nei primi tre mesi di vita, e farmaci a base di  $17\beta$ -estradiolo o suoi derivati sotto forma di esteri ai fini dell'induzione dell'estro nei bovini, equini, ovini e caprini. Tuttavia, in tale art. è specificato che l'uso di questi medicinali contenenti  $17\beta$ -estradiolo è consentito fino al 14 ottobre 2006. Come per il trattamento terapeutico, anche quello zootecnico è vietato per gli animali da produzione. Lo stesso vige per gli animali da riproduzione a fine carriera durante il periodo di ingrasso.

- Registro dei trattamenti: i trattamenti terapeutici effettuati devono essere registrati dal veterinario curante in un registro vidimato dal Servizio Veterinario della AUSL territorialmente competente. Tale registro deve essere conservato in azienda dal titolare, insieme alla copia delle ricette veterinarie, per almeno 5 anni (art. 4). Anche nel caso di trattamento zootecnico il veterinario deve registrare i medicinali prescritti in un apposito registro (art. 5).
- Ricetta: ai sensi dell'art.5 il veterinario, nell'eventualità di un trattamento zootecnico, deve compilare una ricetta in triplice copia non ripetibile, in cui riportare con esattezza il trattamento zootecnico previsto e la quantità di prodotto necessario.
- Comunicazione dei trattamenti al Servizio Veterinario della AUSL: il trattamento, sia a scopo terapeutico che zootecnico, deve essere comunicato entro tre giorni dal veterinario curante al Servizio Veterinario della AUSL



territorialmente competente. Tale comunicazione deve riportare l'ubicazione dell'azienda, i dati del detentore degli animali trattati, nonché il numero identificativo di questi ultimi, il medicinale veterinario impiegato con relativo tempo di sospensione, la data e il tipo di intervento eseguito (art. 5).

- Divieto di autorizzazione all'immissione in commercio: l'art. 6 regola il divieto della commercializzazione di sostanze ormonali che agiscono mediante un effetto deposito, oppure il cui tempo di sospensione è superiore a 15 giorni dopo la fine del trattamento. Lo stesso vale per le sostanze  $\beta$ -agoniste il cui tempo di sospensione è superiore a 28 giorni dopo la fine del trattamento.
- Autocontrollo: il responsabile dello stabilimento di macellazione e di prima trasformazione dei prodotti di origine animale deve mettere in pratica un piano di autocontrollo finalizzato a garantire che vengano introdotti esclusivamente animali per i quali l'allevatore abbia assicurato il rispetto dei tempi di sospensione e che, lo stesso vale per i prodotti di origine animale, tali animali non contengano residui superiori ai limiti massimi consentiti, e non siano stati trattati con sostanze non autorizzate (art. 14).
- Controlli: ai sensi dell'art. 16 l'autorità sanitaria competente deve procedere all'esecuzione di controlli a campione nelle fasi di produzione, manipolazione, magazzinaggio, trasporto, distribuzione, vendita ed acquisto delle sostanze di cui all'allegato I, categoria A, ovvero sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate (stilbeni e loro derivati, agenti antitiroidei, steroidi, lattoni dell'acido resorcilico,  $\beta$ -agonisti, sostanze incluse nell'allegato IV del Regolamento 2377/90/CEE). Inoltre, l'autorità competente deve procedere al controllo dei mangimi destinati agli animali, sia nella fase di produzione che in quella di distribuzione, nonché a controlli durante il processo di allevamento degli animali e di prima trasformazione dei prodotti di origine animale. I controlli effettuati mirano a rilevare l'eventuale presenza di trattamento illecito, ovvero "l'utilizzazione di sostanze o prodotti non autorizzati, ovvero di sostanze o prodotti autorizzati, a fini o a condizioni diversi da quelli previsti dalle disposizioni vigenti". Qualora l'Autorità competente, a seguito di un'indagine, sospetti o abbia conferma di un trattamento illecito, è tenuta, ai sensi dell'art. 18, ad effettuare controlli accurati sugli animali presenti nell'azienda di origine o provenienza con la possibilità di effettuare controlli analitici su animali detenuti, alimenti a loro destinati e acqua di abbeveraggio.

- Sanzioni: L'art. 32 stabilisce le sanzioni amministrative previste per la violazione delle norme contenute nel presente Decreto.

Qualche anno più tardi, il D. Lgs 158/2006 è stato modificato dal D. Lgs 148/2009<sup>11</sup> (attuazione della Direttiva 2008/97/CE). Le principali variazioni apportate riguardano l'impiego a scopo terapeutico di alcune sostanze, ovvero non è più consentito somministrare trenbolone allilico agli animali da compagnia ma solamente agli equidi per via orale. Inoltre è stato vietato di utilizzare medicinali veterinari contenenti 17 $\beta$ -estradiolo e suoi derivati sotto forma di esteri per il trattamento di macerazione o mummificazione fetale e della piometra nei bovini (D. Lgs 148/2009).

### **3.2.1 Disputa sull'impiego degli ormoni tra UE e USA**

La differente legislazione tra i Paesi dell'Unione Europea (UE) e altri Paesi, tra i quali gli Stati Uniti d'America (USA), in merito all'impiego degli ormoni come promotori di crescita negli animali d'allevamento, ha indotto l'UE a vietare le importazioni di carne bovina dagli USA, per tutelare la sicurezza alimentare dei consumatori. Tale divieto ha dato il via ad una battaglia commerciale che ha avuto ripercussioni negative sulle relazioni commerciali transatlantiche, con l'imposizione da parte degli USA di sanzioni commerciali ai prodotti provenienti dalla UE. La costante applicazione di dazi di ritorsione su determinati prodotti europei ha ostacolato le esportazioni, con conseguenti perdite di quote di mercato per i prodotti comunitari, quali carne bovina e suina, formaggio Roquefort, cioccolato, succhi, marmellate e tartufi (<http://www.europarl.europa.eu/news/it/>).

I promotori di crescita sono ampiamente utilizzati per la produzione di carne bovina negli USA sin dagli anni '50. La Food and Drug Administration (FDA) e il Department of Agriculture (USDA) sostengono che la carne proveniente da bovini trattati con ormoni promotori di crescita non abbiano alcun significato fisiologico nel consumatore.

---

<sup>11</sup> Decreto Legislativo 29 ottobre 2009, n. 148: "Attuazione della direttiva 2008/97/CE, che modifica la direttiva 96/22/CE concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali.

Oltre agli USA, altri Paesi hanno approvato l'uso di ormoni promotori di crescita nella produzione di carne bovina, tra i quali Canada, Australia, Nuova Zelanda, Sud Africa, Messico, Cile e Giappone (Johnson e Hanrahan, 2010).

Già a partire dal 1981, con la Direttiva 81/602/CEE, l'UE aveva adottato il divieto di importazione di animali da produzione che avessero subito trattamenti ormonali illeciti, nonché delle loro carni.

Dal 1 gennaio 1989 l'UE ha attuato pienamente il divieto, inizialmente per tre ormoni naturali (17 $\beta$ -estradiolo, testosterone e progesterone), e per tre ormoni sintetici (zeranolo, trenbolone acetato e melengestrol acetato). Da quel momento era possibile solamente importare carne di animali certificati come non trattati. Tale divieto riflette l'approccio dell'UE alla politica di sicurezza alimentare, noto come principio di precauzione. Anche considerazioni politiche ed economiche hanno probabilmente contribuito alla decisione della Commissione di proseguire nel tempo la sua battaglia politica di vietare l'importazione di carne proveniente da animali trattati con sostanze ormonali. Infatti, molti allevatori europei hanno sostenuto tale divieto anche per una questione di concorrenza sul mercato. Inoltre, i responsabili delle politiche agricole dell'UE si sono opposti per evitare una crisi del settore agricolo con conseguente aumento della disoccupazione (Johnson e Hanrahan, 2010).

Gli USA hanno contestato formalmente presso il WTO la decisione Comunitaria di vietare l'importazione di carne e prodotti derivati di animali trattati con gli ormoni sopra citati, e per tale motivo l'Unione Europea è stata sanzionata. Pertanto, su richiesta della Commissione, il comitato scientifico per le misure veterinarie in relazione con la salute pubblica (CSMVSP) è stato incaricato di definire il rischio potenziale per la salute umana derivante dai residui di ormoni nella carne bovina ed i suoi derivati.

Tra il 1999 e il 2002, il CSMVSP ha rilasciato una serie di pareri, basati su studi epidemiologici, sui rischi potenziali per la salute umana dei residui di ormoni nella carne bovina e di prodotti a base di carne, nei quali venne stabilito un divieto definitivo per l'importazione di animali (e loro carni) trattati con 17 $\beta$ -estradiolo, riconosciuto come carcinogeno, mentre un divieto provvisorio per quanto riguarda gli altri cinque ormoni (testosterone, progesterone, trenbolone acetato, zeranolo e melengestrol acetato) (Direttiva 2003/74/CE)

Gli USA invece hanno sempre sostenuto che l'UE non fosse stata in grado di utilizzare metodi valutativi adeguati nei loro studi e che avesse completamente ignorato la grande quantità di studi epidemiologici che indicavano come il 17 $\beta$ -estradiolo non contribuisse

al alcun aumento del rischio cancerogeno e che le carni di animali trattati con ormoni fossero sicure per il consumatore.

Tale disputa ha trovato un punto d'incontro solamente nel maggio 2009, quando è stato firmato un accordo negoziato dalla Commissione europea e dal governo degli Stati Uniti che prevedeva un meccanismo in due fasi per ridurre progressivamente il livello delle sanzioni imposte dagli Stati Uniti sui prodotti dell'UE, mentre l'UE ha progressivamente aumentato le quantità importabili nell'UE per le carni bovine di "alta qualità" prive di ormoni (Johnson e Hanrahan, 2010).

Nel maggio del 2011 le sanzioni Usa sono state del tutto revocate, mentre l'anno seguente è stato siglato un accordo approvato dal Parlamento europeo, con gli Usa che hanno ottenuto come contropartita la possibilità di esportare carne bovina ottenuta senza impiego di ormoni nella Ue per un quantitativo massimo di 48.200 tonnellate (<http://www.europarl.europa.eu/news/it/>).

Questo accordo ha posto forse una fine ad una lunga e dannosa controversia, permettendo la revoca integrale delle sanzioni imposte dagli Stati Uniti ai produttori dell'Unione europea, molti dei quali italiani, e mantenendo, al tempo stesso, il divieto riguardo alle importazioni di carne trattate con ormoni a garanzia dei nostri alti standard di qualità e sicurezza alimentare.

### 3.3 I controlli analitici

La necessità di garantire un'adeguata qualità del dato, soprattutto per determinazioni analitiche complesse come quelle riguardanti la presenza di sostanze in tracce (residui), considerate anche la disomogeneità dei laboratori coinvolti nei vari Paesi e la difficoltà di analisi per dette sostanze, ha indotto l'allora Comunità Europea, all'inizio degli anni '90, ad istituire il sistema dei Laboratori Comunitari di Riferimento (LCR) per i residui negli animali vivi e nei loro prodotti (Caroli, 2002).

Successivamente, la Direttiva 93/99/CEE<sup>12</sup> ribadiva la necessità dell'introduzione di un sistema di norme di qualità per i laboratori incaricati dagli Stati membri di effettuare il controllo ufficiale delle derrate alimentari, basato su norme standardizzate. In virtù di tale Direttiva, ogni Stato membro, dal 1° novembre 1998, doveva provvedere alla conformità di tali laboratori ai criteri generali stabiliti dalla norma europea UNI CEI EN 45001 (accreditamento), alla designazione degli organismi per la valutazione e il riconoscimento dei laboratori preposti al controllo ufficiale, secondo i criteri generali stabiliti dalla norma europea UNI CEI EN 45003, e alla valutazione dei laboratori di prova secondo i requisiti stabiliti dalla norma UNI CEI EN 45002.

Nel novembre 1998 in Italia, solamente alcune strutture operavano in conformità alla norma EN 45001 o erano in attesa di verifiche ispettive da parte del SINAL (Sistema Nazionale per l'Accreditamento dei Laboratori di prova).

Fu poi emanata la Direttiva 96/23/CE, volta a migliorare l'efficacia dei piani di controllo predisposti ogni anno dagli Stati membri, a garantire la comparabilità dei risultati conseguiti e ad armonizzare le modalità di applicazione per il campionamento.

In relazione alle modalità per le procedure di campionamento e per il trattamento dei campioni ufficiali, venne emanata la Decisione 98/179/CE<sup>13</sup>, la quale stabiliva che, l'analisi dei campioni doveva essere effettuata esclusivamente presso laboratori per il controllo ufficiale dei residui riconosciuti dall'autorità competente e che i laboratori autorizzati erano tenuti a partecipare ad un programma esterno, riconosciuto sul piano internazionale, di valutazione qualitativa e di accreditamento, quest'ultimo da

---

<sup>12</sup> Direttiva 93/99/CEE del Consiglio, del 29 ottobre 1993, riguardante misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari. Recepita con il D.Lgs.26/05/1997, n.156. Attuazione della Direttiva 93/99/CE concernente misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari.

<sup>13</sup> 98/179/CE: Decisione della Commissione del 23 febbraio 1998 recante modalità d'applicazione per il prelievo ufficiale di campioni al fine della sorveglianza su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei prodotti di origine animale.

conseguire prima del 1° gennaio 2002. Inoltre, suddetti laboratori dovevano dimostrare la propria competenza partecipando regolarmente e con successo ad appositi programmi di verifica, riconosciuti od organizzati dai Laboratori di Riferimento Nazionali o Comunitari (Caroli, 2002).

A partire dal 2002, quindi, i laboratori per il controllo ufficiale dovevano essere accreditati secondo la UNI CEI EN ISO/IEC 17025 (in sostituzione dal 2000 della EN 45001) per garantire la qualità dei risultati delle analisi dei campioni, come recita anche l'art. 5 della Decisione 2002/657/CE<sup>14</sup>: “Gli Stati membri garantiscono la qualità dei risultati delle analisi dei campioni prelevati a norma della direttiva 96/23/CE, in particolare attraverso la sorveglianza delle analisi e/o la calibrazione dei risultati in ossequio al capitolo 5.9 della ISO 17025”. La Decisione, relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati, costituisce ancora oggi un punto di riferimento, perché si configura come un provvedimento completo e specifico per la determinazione di sostanze in tracce (SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008).

Essa si pone l'obiettivo di (Ferranti e Palleschi, 2011):

- Garantire l'attuazione armonizzata della Direttiva 96/23/CE, concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti;
- Assicurare la qualità e la comparabilità dei risultati analitici prodotti dai laboratori per il controllo ufficiale dei residui;
- Determinare criteri comuni per l'interpretazione dei risultati delle prove dei laboratori di controllo ufficiali;
- Designare metodi validati in accordo a procedure e criteri di rendimento comuni;
- Istituire limiti minimi di rendimento richiesti (LMRR) dei metodi analitici per le sostanze per le quali non è stato definito alcun limite consentito ed in particolare per quelle sostanze il cui impiego non è autorizzato oppure espressamente vietato all'interno della Comunità;

Inoltre, la Decisione supera la precedente distinzione, riportata nella Direttiva 96/23/CE,

---

<sup>14</sup> 2002/657/CE: Decisione della Commissione, del 12 agosto 2002, che attua la Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (GUCE L221/8 del 17.08.2002). Precedentemente, con il nome di SANCO/1085/2000, era stata diffusa una bozza di revisione della Decisione 93/256/CE.

tra metodi di *routine* e di riferimento, differenziando solo i metodi di screening e quelli di conferma. I metodi di screening sono utilizzati per rilevare la presenza di una sostanza o di una classe di sostanze al livello di interesse. Tali metodi sono concepiti per analizzare un gran numero di campioni in tempi brevi e per evitare risultati falsi conformi. Per finalità di screening possono essere utilizzate solo quelle tecniche la cui validazione possa essere dimostrata e che al livello di interesse presentino un tasso di falsi conformi inferiore al 5% (errore  $\beta < 5\%$ ). Nel caso di un campione sospetto all'esame di screening, tale risultato deve venire confermato per mezzo di un metodo di conferma. Quest'ultimo fornisce informazioni complete o complementari sulla struttura chimica dell'analita al fine di identificarlo e, se necessario, quantificarlo al livello di interesse. Proprio per garantire questo, al contrario dello screening per cui non esistono prescrizioni particolari, la Decisione stabilisce che, per un esame di conferma, possano essere utilizzate solo tecniche strumentali con requisiti ben precisi (Decisione 2002/657/CE).

L'obiettivo della Decisione 2002/657/CE è stato, quindi, quello di garantire l'adozione di procedure analitiche con performances prestabilite e controllate (*performances-based approach*). Quindi, se da un lato si registra molta flessibilità dal punto di vista delle scelte di ciascun laboratorio che adotta protocolli analitici interni, dall'altro, vi è estremo rigore sui criteri minimi di qualità da rispettare, affinché un metodo di prova risulti adeguato per il controllo ufficiale dei residui negli alimenti.

### **3.3.1 I metodi di screening e di conferma**

La decisione 2002/657/CE prevede espressamente, per la ricerca di residui negli animali e nelle loro produzioni, l'utilizzo di metodi di screening, il cui ruolo è quello di individuare, tra la massa dei campioni in arrivo, quelli sospetti. I metodi di conferma, generalmente più sofisticati e costosi, possono tecnicamente essere utilizzati anche come primo approccio analitico, specie nel caso in cui non siano disponibili idonei metodi di screening. Tuttavia, questi ultimi, quando disponibili, risulta conveniente utilizzarli, in quanto consentono di ottenere una maggiore produttività a costi contenuti e in tempi brevi.

Come detto in precedenza, per i metodi di conferma, per la ricerca di residui o contaminanti organici, la normativa europea vigente contempla l'uso esclusivamente di determinate tecniche strumentali, elencate nella Tabella 6 (Tabella 1 della Decisione 2002/657/CE), in grado di fornire adeguate garanzie di riconoscimento delle molecole da ricercare. Ad esempio, i metodi basati solo sull'analisi cromatografica senza l'utilizzo della rilevazione con tecniche di spettrometria di massa, non sono adeguati all'impiego come metodi di conferma senza il ricorso ad altri metodi.



Tabella 6 - Metodi di conferma adeguati per residui o contaminanti organici

Tecnica di misurazione	Sostanze allegato I 96/23/CE	Limitazioni
LC o GC con rilevazione attraverso spettrometria di massa	Gruppo A e B	Solo in seguito a una separazione cromatografica on-line o off-line Solo se vengono impiegate tecniche a scansione completa o si utilizzano almeno 3 (per il gruppo B) o 4 (per il gruppo A) punti di identificazione per le tecniche che non registrano gli spettri completi della massa
LC o GC con rilevazione attraverso spettrometria a infrarossi	Gruppo A e B	Nella spettrometria a infrarossi è necessario rispettare le prescrizioni specifiche per l'assorbimento
LC a scansione totale (DAD)	Gruppo B	Nella spettrometria a raggi ultravioletti è necessario rispettare requisiti specifici per l'assorbimento
LC-fluorescenza	Gruppo B	Solo per le molecole che presentano una fluorescenza nativa e le molecole che presentano fluorescenza dopo trasformazione o derivazione
2-D TLC-UV/VIS a scansione completa	Gruppo B	La HPTLC bidimensionale e la co-cromatografia sono obbligatorie
GC con rilevamento della cattura degli elettroni	Gruppo B	Solo se vengono utilizzate colonne di polarità differente
LC-immunogramma	Gruppo B	Solo se vengono impiegati almeno due sistemi cromatografici differenti oppure un secondo metodo di rilevazione indipendente
LC-UV/VIS (lunghezza d'onda unica)	Gruppo B	Solo se vengono impiegati almeno due sistemi cromatografici differenti oppure un secondo metodo di rilevazione indipendente

Per lo screening, invece, non è prevista alcuna restrizione da questo punto di vista, ma sono richieste, come per i metodi di conferma, anche se in minor numero, rigide *performances* metodologiche, come si può dedurre dalla tabella 7 seguente (Tabella 9 della Decisione 2002/657/CE). Lo screening è un test a risposta binaria (negativo/sospetto), che non presenta le problematiche di un esito quantitativo, come quello ottenuto con i metodi di conferma.

Tabella 7 - Classificazione di metodi analitici in base alle caratteristiche di rendimento che devono essere determinate

		Limite di rilevazione $CC\beta$	Limite di decisione $CC\alpha$	Esattezza / Recupero	Precisione	Selettività/ Specificità	Applicabilità / Robustezza/ Stabilità
Metodi qualitativi	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Metodi quantitativi	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = metodi di screening; C = metodi di conferma; + = la determinazione è obbligatoria; - = la determinazione è facoltativa.

I parametri della Tabella 2 devono essere determinati durante lo studio di validazione di un metodo, che è la “conferma attraverso l’esame e l’apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l’utilizzazione prevista siano soddisfatti” (UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

Tra i parametri di *performances* vi sono (Decisione 2002/657/CE):

- Limite di decisione ( $CC\alpha$  = Critical Concentration  $\alpha$ ): limite al quale e oltre il quale è possibile concludere con una probabilità di errore pari ad  $\alpha$  che un campione è non conforme. L’errore  $\alpha$  rappresenta la probabilità che il campione sottoposto ad analisi sia conforme, sebbene sia stata ottenuta una misura non conforme (decisione di falsa non conformità o falsa positività). Come si può vedere in Tabella 2, il  $CC\alpha$  non è un parametro obbligatorio per lo screening qualitativo. Tuttavia, esso è utile per definire il *cut-off* del metodo.
- Capacità di rilevazione ( $CC\beta$  = Critical Concentration  $\beta$ ): è il contenuto più piccolo della sostanza che è possibile rilevare, identificare e/o quantificare in un campione con la probabilità di un errore  $\beta$ . L’errore  $\beta$  rappresenta la probabilità che il campione sottoposto ad analisi sia effettivamente non conforme, sebbene sia stata ottenuta una misura conforme (decisione di falsa conformità o falsa negatività). Se per una sostanza non è stato stabilito un limite consentito, la capacità di rilevazione è il livello di concentrazione più basso al quale un metodo è in grado di rilevare campioni effettivamente contaminati con una

certezza statistica di  $1 - \beta$ . Per le sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito, ciò significa che la capacità di rilevazione è la concentrazione alla quale il metodo è in grado di rilevare le concentrazioni limite consentite con una certezza statistica di  $1 - \beta$ .

Questo parametro è fondamentale per i metodi di screening in quanto, se una decisione falsa positiva comporta un'analisi "inutile" di un campione con un metodo di conferma, diversamente una decisione falsa negativa ha come ripercussione la commercializzazione di alimenti potenzialmente contaminati. La massima percentuale di errore  $\beta$  ammessa dalla Decisione 2002/657/CE è il 5%.

- **Robustezza:** è la capacità posseduta da un metodo di non essere influenzato significativamente, in termini di risultati finali, da variazioni deliberatamente introdotte nelle sue fasi di effettuazione. Questo parametro serve a qualificare l'affidabilità di una procedura durante il suo utilizzo *routinario* o la possibilità di riprodurre il metodo analitico in differenti laboratori e in tempi diversi, senza una differenza significativa nei risultati.
- **Specificità:** è l'abilità di un metodo di rilevare solo quello che intende rilevare, ovvero la sua capacità di non risentire della presenza di interferenti o di altri componenti diversi dagli analiti in esame. La mancanza di specificità si ripercuote sulla presenza di campioni falsi positivi e falsi negativi. Se per questi ultimi la Decisione 2002/657/CE impone una percentuale massima del 5%, il controllo della percentuale dei falsi positivi è fondamentale ai fini della gestione del test stesso. Infatti, per lo screening un'elevata percentuale di falsi positivi rende inutile la prova stessa, così come la ripetizione dell'analisi dei campioni con un metodo di conferma.
- **Esattezza:** è il grado di accordo tra il valore medio ottenuto da un numero ampio di risultati e un valore di riferimento accettato.
- **Recupero:** è la percentuale di concentrazione di una sostanza recuperata nel corso di una procedura analitica. E' determinata durante la fase di validazione se non è disponibile alcun materiale di riferimento certificato.
- **Precisione:** rappresenta il grado di accordo tra risultati indipendenti ottenuti in condizioni definite.

Le tecniche di screening più utilizzate per la ricerca di sostanze ad azione anabolizzante sono quelle rappresentate da metodi immunoenzimatici, in particolare l'ELISA, mentre per la conferma di eventuali sospetti vengono impiegate la gas cromatografia (GC) o la cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa (MS).

## **Parte sperimentale**

#### **4. SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare la prevalenza del fenomeno relativo ai trattamenti illeciti con sostanze ormonali nei bovini da carne macellati in uno stabilimento di macellazione operante sul territorio nazionale.

A tal fine è stata condotta un'indagine basata su osservazioni cliniche e comportamentali dell'animale, sull'eventuale riscontro di lesioni anatomo-patologiche macroscopiche a carico di alcuni organi bersaglio e sull'esame istologico, quale metodo di screening, di campioni di tali organi.

## 5. MATERIALI E METODI

Nel biennio 2012-2013, sono state esaminate, presso uno stabilimento di macellazione operante sul territorio nazionale, 43 partite di bovini da carne regolarmente macellati, di entrambi i sessi e di età non superiore a 18 mesi, provenienti da allevamenti sia di tipo intensivo che familiare. La maggior parte delle partite comprendeva bovini nati in Francia, ivi allevati per un certo periodo e poi trasportati nell'allevamento italiano.

Complessivamente sono stati sottoposti al controllo per l'individuazione di eventuali trattamenti ormonali illeciti, 90 capi, di cui 50 maschi e 40 femmine, di razza Limousine, Charolaise, Croisé, Aubrac, Altre Razze Pezzate Nere, Altre Razze Pezzate Rosse, Meticcio/Incrocio e Romagnola, che presentavano al momento della macellazione un'età che variava, a seconda del soggetto, dagli 11 ai 18 mesi (vedi tabella 1 e 2).

I soggetti sono stati scelti tenendo conto che l'unità di campionamento, da selezionare in modo del tutto causale, era rappresentata dalla singola partita, ovvero da un gruppo di animali della stessa categoria di età (non superiore a 18 mesi), provenienti dallo stesso allevamento, e inviati contemporaneamente all'impianto di macellazione.

La dimensione campionaria è stata calcolata utilizzando il software FreeCalc vers. 2.1 creato appositamente per questo tipo di indagini. Nel calcolo del numero di bovini statisticamente rappresentativo da sottoporre a verifica si è, quindi, tenuto conto del numero di capi macellati all'anno nello stabilimento, ovvero 3500, assumendo inoltre che il test istologico fosse caratterizzato da specificità pari al 100%, sensibilità all'80%, e considerando una prevalenza attesa del 5%. Il numero ottenuto si è rivelato pari a 95 bovini, di poco superiore rispetto alla dimensione della popolazione oggetto di questa indagine.

Il numero di soggetti da campionare per ogni partita è stato ottenuto applicando la formula di Cannon & Roe (Tabella 3).

Tabella 1 - Soggetti maschi

N°	RAZZA	ETA' (mesi)	NATO IN	ALLEVATO IN
1	Limousine	11	Francia	Italia
2	Limousine	16	Francia	Italia
3	Aubrac	18	Francia	Italia
4	Limousine	13	Francia	Italia
5	Limousine	16	Francia	Italia
6	Meticcio/incrocio	11	Italia	Italia
7	Meticcio/incrocio	14	Italia	Italia
8	Charolaise	14	Francia	Italia
9	Charolaise	15	Francia	Italia
10	Meticcio/incrocio	15	Italia	Italia
11	Charolaise	14	Francia	Italia
12	Charolaise	14	Francia	Italia
13	Limousine	14	Francia	Italia
14	Limousine	13	Francia	Italia
15	Aubrac	18	Francia	Italia
16	Limousine	18	Francia	Italia
17	Limousine	13	Francia	Italia
18	Limousine	13	Francia	Italia
19	Limousine	14	Francia	Italia
20	Limousine	13	Francia	Italia
21	Limousine	13	Francia	Italia
22	Limousine	14	Francia	Italia
23	Limousine	13	Francia	Italia
24	Limousine	13	Francia	Italia
25	Limousine	14	Francia	Italia
26	Limousine	14	Francia	Italia
27	Limousine	14	Francia	Italia
28	Meticcio/incrocio	14	Italia	Italia



29	Croisé	16	Francia	Italia
30	Meticcio/incrocio	15	Italia	Italia
31	Limousine	17	Francia	Italia
32	Limousine	17	Francia	Italia
33	Meticcio/incrocio	14	Italia	Italia
34	Limousine	17	Francia	Italia
35	Limousine	17	Francia	Italia
36	Meticcio/incrocio	18	Italia	Italia
37	Meticcio/incrocio	13	Italia	Italia
38	Meticcio/incrocio	13	Italia	Italia
39	Meticcio/incrocio	16	Italia	Italia
40	Limousine	13	Francia	Italia
41	Meticcio/incrocio	17	Italia	Italia
42	Limousine	14	Francia	Italia
43	Limousine	15	Italia	Italia
44	Limousine	14	Francia	Italia
45	Altre razze pezzate nere	18	Italia	Italia
46	Altre razze pezzate nere	18	Italia	Italia
47	Limousine	13	Francia	Italia
48	Romagnola	16	Italia	Italia
49	Meticcio/incrocio	11	Italia	Italia
50	Limousine	14	Francia	Italia

Tabella 2 - Soggetti femmine

N°	RAZZA	ETA' (mesi)	NATO IN	ALLEVATO IN
51	Limousine	15	Francia	Italia
52	Limousine	13	Francia	Italia
53	Limousine	12	Francia	Italia
54	Limousine	12	Francia	Italia
55	Limousine	11	Francia	Italia
56	Limousine	11	Francia	Italia
57	Limousine	15	Francia	Italia
58	Meticcio/incrocio	15	Italia	Italia
59	Limousine	15	Francia	Italia
60	Limousine	16	Francia	Italia
61	Limousine	16	Francia	Italia
62	Limousine	15	Francia	Italia
63	Limousine	15	Francia	Italia
64	Limousine	16	Francia	Italia
65	Limousine	17	Francia	Italia
66	Limousine	16	Francia	Italia
67	Limousine	14	Francia	Italia
68	Limousine	16	Francia	Italia
69	Limousine	15	Francia	Italia
70	Meticcio/incrocio	17	Italia	Italia
71	Limousine	16	Francia	Italia
72	Limousine	15	Francia	Italia
73	Limousine	14	Francia	Italia
74	Meticcio/incrocio	13	Italia	Italia
75	Limousine	14	Francia	Italia
76	Limousine	15	Francia	Italia
77	Limousine	15	Francia	Italia
78	Limousine	18	Francia	Italia

79	Limousine	18	Francia	Italia
80	Limousine	17	Francia	Italia
81	Limousine	14	Francia	Italia
82	Limousine	12	Francia	Italia
83	Altre razze pezzate rosse	17	Italia	Italia
84	Limousine	12	Francia	Italia
85	Limousine	13	Francia	Italia
86	Limousine	18	Francia	Italia
87	Limousine	13	Francia	Italia
88	Limousine	13	Italia	Italia
89	Meticcio/incrocio	11	Italia	Italia
90	Limousine	13	Italia	Italia

Tabella 3 - Tabella di riferimento per la determinazione del numero di soggetti da campionare per partita (Cannon & Roe)

Dimensione della partita	Dimensione del campione
1-3	Tutti i soggetti
4-5	3
6-19	4
20-70	5

Una volta determinato il numero di soggetti da campionare per una determinata partita, si è proceduto mediante campionamento di tipo sistematico in modo da escludere qualsiasi valutazione soggettiva.

I soggetti campionati sono stati sottoposti a:

- Controllo documentale
- Visita ante-mortem
- Visita post-mortem
- Prelievo campioni al macello
- Processazione del campione (procedura)
- Esame istologico dei campioni prelevati: lettura e diagnosi

#### Controllo documentale

All'arrivo della partita al macello sono stati effettuati i regolari controlli documentali, come previsto dalla Direttiva 96/22CE, ovvero della Dichiarazione di provenienza e destinazione degli animali (Mod. IV), e del Passaporto. In particolare, sono state verificate e registrate la data di nascita del bovino, per essere sicuri in seguito di campionare soggetti che appartenevano alla categoria d'età d'interesse, il sesso, la razza, gli eventuali spostamenti effettuati dall'allevamento di prima identificazione sino allo stabilimento di macellazione, e soprattutto la dichiarazione per il macello da parte del detentore degli animali che questi ultimi:

- ✓ Non fossero stati trattati o alimentati con sostanze di cui è vietato l'impiego;
- ✓ Non fossero stati trattati nei 90 giorni precedenti l'avvio alla macellazione con sostanze di cui agli art. 4 e 5 del D.Lgs 158/2006 ovvero  $\beta$ -agonisti (le uniche sostanze permesse in deroga negli animali da produzione per l'induzione della

tocolisi), nonché con alimenti medicamentosi e specialità medicinali, e che in tal caso fossero stati rispettati i previsti periodi di sospensione per questi trattamenti.

#### Visita ante-mortem

Come è stato detto nei capitoli precedenti per ogni categoria di molecole, la somministrazione di sostanze a scopo anabolizzante determina negli animali trattati delle alterazioni che possono essere rilevabili alla visita ante-mortem. Quindi, una volta scelti i soggetti da campionare, sono stati effettuati su di essi esami clinici al fine di verificare eventuali:

- ✓ Alterazioni del comportamento: in particolare, sono stati ricercati nell'animale, stati di ipereccitazione, paura, aggressività, aumento della libido o, al contrario, atteggiamenti di sottomissione e docilità, riconducibili all'impiego di molecole appartenenti alla categoria degli ormoni sessuali, ed anche uno stato euforizzante dovuto presumibilmente all'utilizzo di corticosteroidi. Inoltre, aumento dell'eccitabilità, accompagnato da dispnea e tremori, riferibili all'impiego di  $\beta$ -agonisti.
- ✓ Modificazione dei parametri zootecnici caratteristici della razza e alterazioni morfo-funzionali di alcuni organi ispezionabili alla visita clinica: con particolare riguardo ad uno sviluppo notevole della muscolatura soprattutto in rapporto all'età e razza.

#### Visita post-mortem

Dopo la macellazione dell'animale, sono stati seguiti la carcassa e i suoi visceri lungo tutta la catena di macellazione per eseguire la visita post-mortem, al fine di ricercare quelle modificazioni anatomo-patologiche a carico degli organi bersaglio riconducibili a trattamenti ormonali illeciti. In particolare, come indice di trattamento con ormoni sessuali, sono stati presi in considerazione, per i maschi, la dimensione dei testicoli (diminuzione) e lo sviluppo della ghiandola mammaria (aumento), mentre sia per i maschi che per le femmine, per la valutazione del trattamento con corticosteroidi è stata esaminata la dimensione del timo (atrofia). Inoltre, in entrambi i sessi, per sospettare un eventuale utilizzo di  $\beta$ -agonisti e tireostatici, sono stati valutati rispettivamente la cresta

tracheale (scomparsa) e la tiroide (ipertrofia).

#### Prelievo dei campioni

Dopo l'esame anatomico-patologico sono stati prelevati per i maschi campioni di timo, prostata e ghiandola bulbo-uretrale, mentre solo campioni di timo per le femmine. Il timo è stato prelevato per la successiva ricerca, tramite esame istologico, di lesioni da trattamento con corticosteroidi, mentre gli altri due organi per la ricerca di lesioni dovute a trattamento con ormoni sessuali. Di seguito sono riportate le modalità di prelievo effettuate organo per organo:

- ✓ Timo: è stato prelevato un frammento, 1x1x2 cm, dal timo toracico, facilmente evidenziabile sulla porzione craniale del mediastino davanti al cuore;
- ✓ Prostata: il prelievo è stato eseguito mediante sezione trasversale della parte disseminata della prostata;
- ✓ Ghiandola bulbo-uretrale: dopo aver prelevato la prostata, sono state localizzate le ghiandole bulbo-uretrali nella porzione caudale dell'uretra sotto al muscolo bulbo-spongioso e ne è stata prelevata una per intero.

I campioni prelevati sono stati successivamente fissati in formalina al 10%, in proporzione 1:10 con il campione, all'interno di appositi contenitori su cui sono stati posti i numeri di riferimento. La fissazione si propone di preservare al meglio la struttura protoplasmatica dalle alterazioni conseguenti alla morte della cellula, con il minimo cambiamento di struttura. Il trattamento chimico con formalina uccide rapidamente la cellula agendo soprattutto sui componenti proteici cellulari ed inattivando gli enzimi, in modo da impedire fenomeni di autolisi. Inoltre, tale pratica consente ai coloranti di penetrare nella cellula e di fissarsi a particolari strutture cellulari mettendole meglio in evidenza.

#### Processamento del campione anatomico (procedura)

In seguito a fissazione in formalina, ciascun campione è stato processato secondo il seguente schema:

- 1) Trimming (riduzione del pezzo anatomico): il campione è stato ridotto in piccoli pezzi, di cui uno è stato posto in un'apposita cassetta di plastica, che ha lo scopo di contenerlo nel corso delle fasi successive;

- 2) Disidratazione e diafanizzazione: poiché il maggior costituente dei tessuti è l'acqua, questa è stata rimossa (disidratazione) mediante immersione del pezzo da esaminare in vaschette contenenti alcool etilico, a concentrazione crescente, partendo da una soluzione al 50% fino ad alcool al 100% (alcool assoluto), per una disidratazione completa. Dopodiché, il tessuto è stato immerso in xilolo. Quest'ultimo processo è chiamato diafanizzazione, in quanto il pezzo di tessuto immerso in xilolo diventa trasparente;
- 3) Inclusione in paraffina: il pezzo anatomico, già diafanizzato in xilolo, è stato immerso in paraffina fusa al calore, consentendo ad essa di impregnarlo completamente. Dopodiché, il pezzo è stato posto in un apposito stampo, coperto con altra paraffina fusa, e il tutto lasciato solidificare per raffreddamento, ottenendo così un blocchetto solido contenente il tessuto. Lo scopo dell'inclusione è stato, quindi, quello di conferire al campione biologico in esame la consistenza necessaria per sottoporlo alla fase seguente di taglio.
- 4) Realizzazione delle sezioni istologiche con microtomo (taglio): il pezzo di tessuto, incluso come sopra descritto, è stato montato su un microtomo (strumento provvisto di una lama e di un braccio che avanza sul pezzo, e, per ogni movimento, esegue sezioni istologiche regolari dello spessore desiderato), dopo che intorno è stato rimosso l'eccesso del mezzo di inclusione (paraffina allo stato solido). Sono state prodotte sezioni di 4-5  $\mu\text{m}$  che, raccolte con un pennellino, sono state distese sulla superficie di acqua riscaldata (40 °C) in un bagnetto termostatico. Successivamente, una sezione istologica è stata prelevata dall'acqua e posta su un vetrino porta-oggetti, che è stato collocato per almeno 12 ore in stufa a 37 °C.
- 5) Colorazione della sezione con ematossilina-eosina: la sezione ottenuta, posta sul vetrino, è stata colorata con una combinazione di coloranti (ematossilina-eosina), con lo scopo di mettere in evidenza i vari componenti delle cellule e dei tessuti. L'ematossilina è una base che colora di blu-violetto i componenti acidi, come i nuclei, mentre l'eosina è un acido che colora di rosa i componenti basici, come il citoplasma e la matrice extracellulare. Prima della colorazione vera e propria, è stato rimosso dalla sezione applicata al vetrino, con adatto solvente (xilolo), il materiale di inclusione (paraffina), e si è proceduto alla reidratazione della sezione mediante passaggio del vetrino in vaschette contenenti alcool etilico a concentrazione decrescente e infine in acqua distillata. Quindi, il vetrino

è stato immerso nella soluzione di ematossilina. Dopo lavaggio e viraggio del colorante nucleare in acqua di fonte, il preparato è stato immerso in una vaschetta contenente eosina e poi di nuovo in acqua. Successivamente, la sezione è stata disidratata in modo tale da poter essere sigillata da un altro vetrino (copri-oggetti) che viene incollato con un materiale di montaggio. Per fare ciò, si è proceduto attraverso il passaggio del vetrino in vaschette contenenti alcool etilico a concentrazione crescente per poi immergerlo nuovamente in xilolo.

- 6) Montaggio del vetrino: al di sopra della sezione colorata, collocata sul vetrino porta-oggetti, è stato applicato a sandwich un altro vetrino molto sottile (vetrino copri-oggetti), che è stato fatto aderire con balsamo del Canada. Dopodiché, il preparato, previa permanenza per qualche ora in termostato per far solidificare il balsamo, era pronto per l'osservazione.

Esame istologico: lettura al microscopio ottico e diagnosi

La lettura dei preparati è stata eseguita utilizzando la “Scheda Diagnostica” (riportata di seguito), per registrare tutte le alterazioni presenti in ciascun organo, e la “Scheda di Valutazione” (riportata di seguito), allo scopo di produrre un giudizio sintetico per ciascun organo, entrambe presenti nella compilazione del Piano Nazionale Residui.

Le osservazioni istologiche relative ai singoli organi bersaglio sono state tradotte in un esito diagnostico a tre classi: Negativo, Dubbio, Sospetto.

L'esito conclusivo riguarda due livelli:

- ✓ Primo livello: è rappresentato dal singolo organo. Esso è considerato negativo quando le caratteristiche dei diversi tessuti sono proprie degli animali di controllo, ovvero fisiologiche; dubbio nel caso il campione presenti lesioni lievi o di nuova comparsa, non fisiologiche, ma non ancora descritte in letteratura; sospetto quando anche uno solo dei tessuti presenta lesioni gravi e note in letteratura, chiaramente riferibili a trattamenti illeciti.
- ✓ Secondo livello: è rappresentato dal soggetto di cui sono esaminati gli organi bersaglio. Esso è classificato come negativo nel caso tutti gli organi siano stati classificati come negativi; dubbio, se anche un solo organo è stato classificato come dubbio, ma nessuno come sospetto; sospetto qualora anche un singolo organo sia stato classificato come tale.



## SCHEDA DIAGNOSTICA

### TIMO (cortisonici)

**NON ESEGUIBILE:**

- Campione non pervenuto ☐  
Partita non conforme ☐  
Età non idonea per analisi ☐

**NON IDONEO:**

- Porzione anatomica errata ☐  
Campione autolitico ☐  
Campione congelato ☐

<b>Atrofia</b>	Assente/lieve <input type="checkbox"/>	Moderata <input type="checkbox"/>	Grave <input type="checkbox"/>
<b>ESITO data base</b>	Negativo <input type="checkbox"/>	Dubbio <input type="checkbox"/>	Sospetto <input type="checkbox"/>
<b>ESITO CONCLUSIVO</b>	<b>Non sospetto</b> <input type="checkbox"/>		<b>Sospetto</b> <input type="checkbox"/>

### PROSTATA (steroidi sessuali)

**NON ESEGUIBILE:**

- Campione non pervenuto ☐  
Partita non conforme ☐  
Età non idonea per analisi ☐

**NON IDONEO:**

- Porzione anatomica errata ☐  
Campione autolitico ☐  
Campione congelato ☐  
Flogosi di tipo follicolare imponente ☐

<b>Tessuto ghiandolare</b>		
<b>Iper/Metaplasia</b>	Normale/ Iperplasia <input type="checkbox"/>	Metaplasia <input type="checkbox"/>
<b>ESITO CONCLUSIVO</b>	<b>Non sospetto</b> <input type="checkbox"/>	<b>Sospetto</b> <input type="checkbox"/>

### GH. BULBO-URETRALI (steroidi sessuali)

**NON ESEGUIBILE:**

- Campione non pervenuto ☐  
Partita non conforme ☐  
Età non idonea per analisi ☐

**NON IDONEO:**

- Porzione anatomica errata ☐  
Campione autolitico ☐  
Campione congelato ☐  
Flogosi di tipo follicolare imponente ☐

<b>Dotti</b>		
<b>Iper/Metaplasia</b>	Normale/ Iperplasia <input type="checkbox"/>	Metaplasia <input type="checkbox"/>
<b>Tessuto ghiandolare</b>		
<b>Iper/Metaplasia</b>	Normale/ Iperplasia <input type="checkbox"/>	Metaplasia <input type="checkbox"/>
<b>ESITO CONCLUSIVO</b>	<b>Non sospetto</b> <input type="checkbox"/>	<b>Sospetto</b> <input type="checkbox"/>

<b>ESITO CONCLUSIVO dell'animale/ data base</b>	<b>Non sospetto</b> <input type="checkbox"/>	<b>Sospetto</b> <input type="checkbox"/>
-------------------------------------------------	----------------------------------------------	------------------------------------------

## SCHEMA DI VALUTAZIONE

Timo		
Lesione	Esito	Esito
Atrofia	VCB	VTN
Assente/Lieve	Negativo	Negativo
Moderata	Sospetto	Dubbio
Grave	Sospetto	Sospetto

Prostata - Tessuto Ghiandolare	
Lesione	Esito
Normale/Iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

Ghiandole Bulbo uretrali - Dotti	
Lesione	Esito
Normale/Iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

Ghiandole Bulbo uretrali – Tessuto Ghiandolare	
Lesione	Esito
Normale/Iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

## **6. RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **Controllo documentale e visita ante-mortem**

I controlli documentali, in particolare la Dichiarazione per il macello, dei bovini esaminati hanno permesso di constatare che questi ultimi non avevano subito trattamenti farmacologici notificati nei 90 giorni precedenti l'avvio alla macellazione.

Inoltre, alla visita ante-mortem non sono state rilevate turbe comportamentali di rilievo né alterazioni macroscopiche morfo-funzionali, relative agli organi esterni, come atrofia testicolare, sviluppo anomalo della ghiandola mammaria ed edema dei genitali nei soggetti impuberi.

### **Visita post-mortem**

All'osservazione delle carcasse non sono state rilevate masse muscolari di proporzioni eccessive tali da sospettare un trattamento con sostanze anabolizzanti. Per quanto riguarda il timo, oltre alla difficoltà nel valutare il grado di atrofia all'esame macroscopico e quindi distinguere tra involuzione fisiologica e atrofia indotta dal trattamento con corticosteroidi, è stata riscontrata, in alcuni casi, la perdita di una parte dell'organo stesso dovuta alle normali operazioni di taglio, effettuate per le procedure di ispezione post-mortem dei visceri. In conclusione, per il timo, non sono state evidenziate modificazioni macroscopiche tali da indurre un sospetto di trattamento con corticosteroidi. Anche alla visita post-mortem non sono state riscontrate atrofia testicolare né uno sviluppo anomalo della ghiandola mammaria. Inoltre, non sono stati rilevati casi di scomparsa della cresta tracheale né di ipertrofia della tiroide.

## Indagine istologica

In seguito all'osservazione macroscopica degli organi, l'indagine su eventuali trattamenti ormonali illeciti è stata approfondita tramite l'esecuzione di esami istologici. I risultati ottenuti, mediante tale metodo di screening, sull'intera popolazione bovina campionata, costituita da 90 capi, di cui 50 maschi e 40 femmine, hanno evidenziato tali percentuali:

- 88,9% negativi (80 soggetti, di cui 46 maschi e 34 femmine)
- 4,4% dubbi (4 soggetti, di cui 1 maschio e 3 femmine)
- 6,7% sospetti (6 soggetti, di cui 3 maschi e 3 femmine)

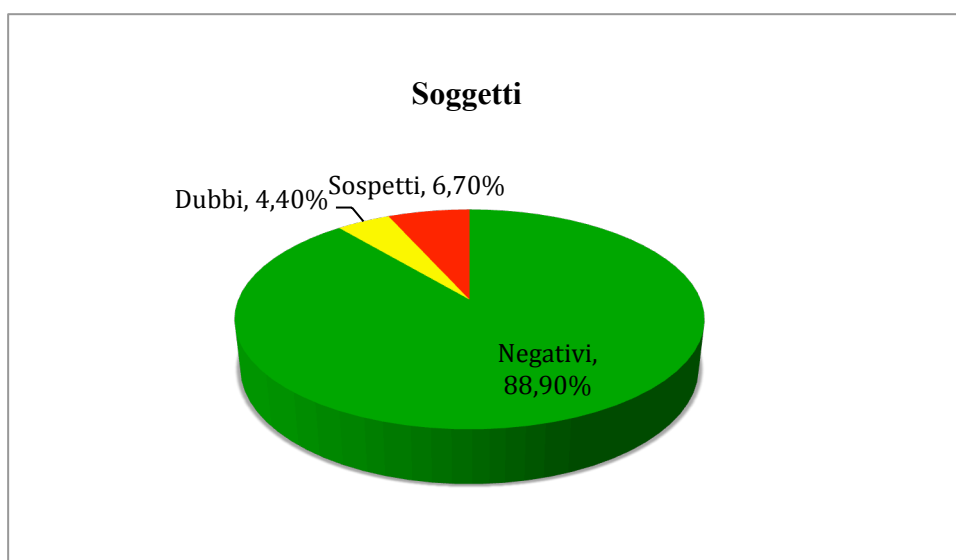


Grafico 1: Risultati in percentuale dei soggetti analizzati (negativi, dubbi, sospetti)

I soggetti giudicati sospetti e dubbi, sono tutti riferibili ad alterazioni riscontrate nel timo e, quindi, riconducibili all'impiego di corticosteroidi, mentre non è stato rilevato nessun campione sospetto o dubbio di trattamento con ormoni sessuali.

Analizzando i risultati distintamente tra i due sessi, possiamo osservare come le percentuali di sospetti non siano molto diverse tra loro:

- Maschi: 92% (n=46) negativi, 2% (n=1) dubbi, 6% (n=3) sospetti
- Femmine: 85% (n=34) negativi, 7,5% (n=3) dubbi, 7,5% (n=3) sospetti

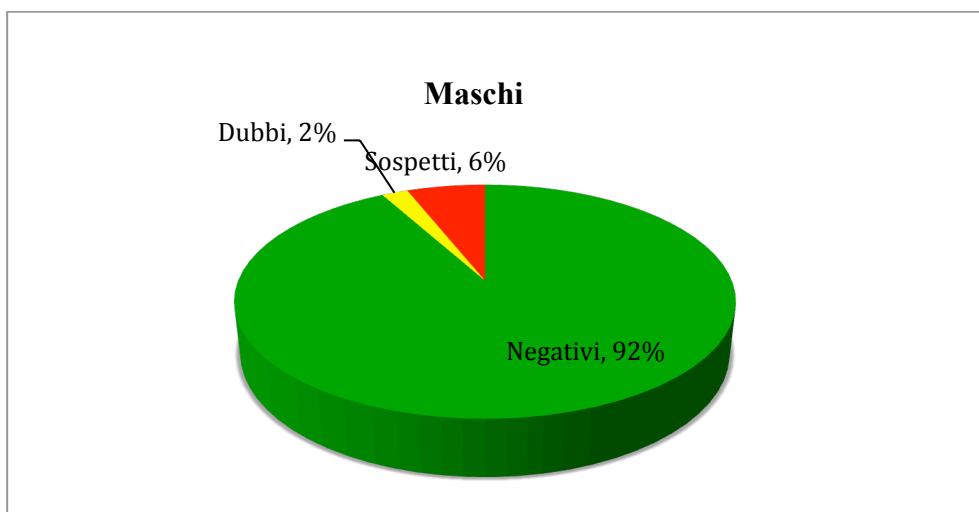


Grafico 2: Risultati in percentuale dei soggetti maschi (negativi, dubbi, sospetti)

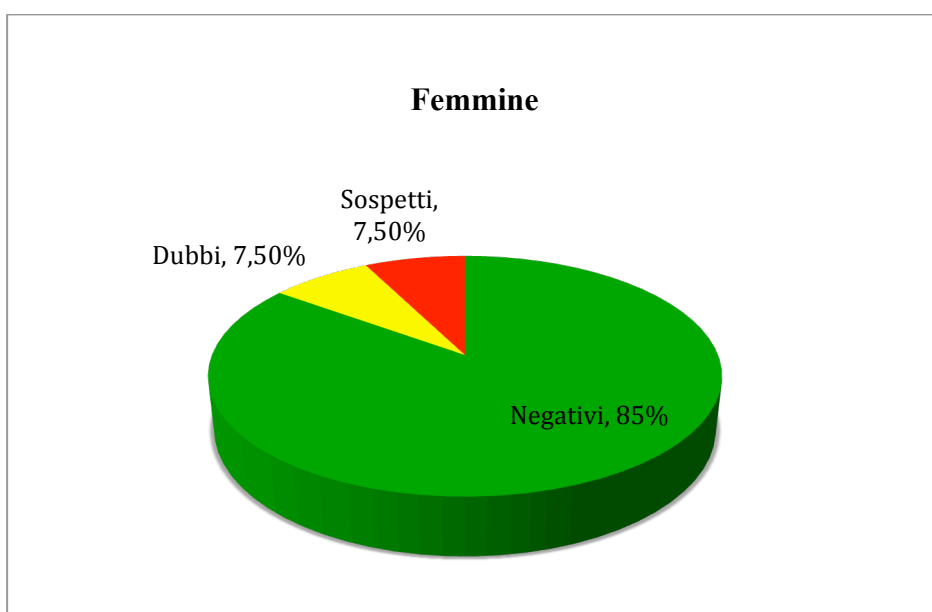


Grafico 3: Risultati in percentuale dei soggetti femmine (negativi, dubbi, sospetti)

Tabella 4 - dati relativi a ciascun soggetto maschio (+=Lieve; ++=Moderata; +++=Grave)

<b>N°</b>	<b>RAZZA</b>	<b>ETA' (mesi)</b>	<b>NATO IN</b>	<b>ALLEVATO IN</b>	<b>TIMO</b>	<b>PROSTATA</b>	<b>BULBO-URETRALE</b>
1	Limousine	11	Francia	Italia	Atrofia +	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
2	Limousine	16	Francia	Italia	Atrofia +	Lieve iperplasia	Normale
3	Aubrac	18	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
4	Limousine	13	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Normale
5	Limousine	16	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Normale
6	Meticcio/ incrocio	11	Italia	Italia	Normale	Normale	Lieve iperplasia
7	Meticcio/ incrocio	14	Italia	Italia	Normale	Normale	Normale
8	Charolaise	14	Francia	Italia	Normale	Normale	Normale
9	Charolaise	15	Francia	Italia	Atrofia +	Lieve iperplasia	Iperplasia
10	Meticcio/ incrocio	15	Italia	Italia	Atrofia +	Iperplasia	Normale
11	Charolaise	14	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
12	Charolaise	14	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia

13	Limousine	14	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
14	Limousine	13	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
15	Aubrac	18	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Normale
16	Limousine	18	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Iperplasia
17	Limousine	13	Francia	Italia	Atrofia +++	Iperplasia	Lieve iperplasia
18	Limousine	13	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
19	Limousine	14	Francia	Italia	Atrofia +	Normale	Normale
20	Limousine	13	Francia	Italia	Atrofia +	Normale	Normale
21	Limousine	13	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
22	Limousine	14	Francia	Italia	Atrofia +++	Normale	Normale
23	Limousine	13	Francia	Italia	Atrofia +++	Normale	Normale
24	Limousine	13	Francia	Italia	Atrofia +	Lieve iperplasia	Normale
25	Limousine	14	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
26	Limousine	14	Francia	Italia	Normale	Iperplasia	Lieve iperplasia

27	Limousine	14	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Normale
28	Meticcio/ incrocio	14	Italia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
29	Croisé	16	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Normale
30	Meticcio/ incrocio	15	Italia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Lieve iperplasia
31	Limousine	17	Francia	Italia	Normale	Iperplasia	Iperplasia
32	Limousine	17	Francia	Italia	Normale	Lieve iperplasia	Iperplasia
33	Meticcio/ incrocio	14	Italia	Italia	Normale	Normale	Iperplasia
34	Limousine	17	Francia	Italia	Atrofia +	Normale	Iperplasia
35	Limousine	17	Francia	Italia	Normale	Normale	Iperplasia
36	Meticcio/ incrocio	18	Italia	Italia	Atrofia ++	Iperplasia	Normale
37	Meticcio/ incrocio	13	Italia	Italia	Normale	Normale	Normale
38	Meticcio/ incrocio	13	Italia	Italia	Normale	Normale	Normale
39	Meticcio/ incrocio	16	Italia	Italia	Atrofia +	Normale	Lieve iperplasia
40	Limousine	13	Francia	Italia	Normale	Normale	Normale



41	Meticcio/ incrocio	17	Italia	Italia	Normale	Normale	Normale
42	Limousine	14	Francia	Italia	Normale	Normale	Normale
43	Limousine	15	Italia	Italia	Normale	Normale	Lieve iperplasia
44	Limousine	14	Francia	Italia	Normale	Normale	Normale
45	Altre razze pezzate nere	18	Italia	Italia	Normale	Normale	Normale
46	Altre razze pezzate nere	18	Italia	Italia	Normale	Normale	Normale
47	Limousine	13	Francia	Italia	Normale	Normale	Normale
48	Romagnola	16	Italia	Italia	Normale	Normale	Lieve iperplasia
49	Meticcio/ incrocio	11	Italia	Italia	Atrofia +	Iperplasia	Iperplasia
50	Limousine	14	Francia	Italia	Normale	Normale	Iperplasia

Tabella 5 - dati relativi a ciascun soggetto femmina (+=Lieve; ++=Moderata; +++=Grave)

N°	RAZZA	ETA' (mesi)	NATO IN	ALLEVATO IN	TIMO
51	Limousine	15	Francia	Italia	Normale
52	Limousine	13	Francia	Italia	Atrofia +++
53	Limousine	12	Francia	Italia	Atrofia +
54	Limousine	12	Francia	Italia	Atrofia +
55	Limousine	11	Francia	Italia	Atrofia ++
56	Limousine	11	Francia	Italia	Atrofia ++
57	Limousine	15	Francia	Italia	Atrofia +
58	Meticcio/incrocio	15	Italia	Italia	Normale
59	Limousine	15	Francia	Italia	Normale
60	Limousine	16	Francia	Italia	Normale
61	Limousine	16	Francia	Italia	Atrofia +
62	Limousine	15	Francia	Italia	Atrofia +

63	Limousine	15	Francia	Italia	Normale
64	Limousine	16	Francia	Italia	Normale
65	Limousine	17	Francia	Italia	Normale
66	Limousine	16	Francia	Italia	Normale
67	Limousine	14	Francia	Italia	Atrofia +++
68	Limousine	16	Francia	Italia	Atrofia +
69	Limousine	15	Francia	Italia	Normale
70	Meticcio/incrocio	17	Italia	Italia	Normale
71	Limousine	16	Francia	Italia	Normale
72	Limousine	15	Francia	Italia	Normale
73	Limousine	14	Francia	Italia	Normale
74	Meticcio/incrocio	13	Italia	Italia	Atrofia +++
75	Limousine	14	Francia	Italia	Normale
76	Limousine	15	Francia	Italia	Atrofia +

77	Limousine	15	Francia	Italia	Normale
78	Limousine	18	Francia	Italia	Normale
79	Limousine	18	Francia	Italia	Normale
80	Limousine	17	Francia	Italia	Normale
81	Limousine	14	Francia	Italia	Normale
82	Limousine	12	Francia	Italia	Normale
83	Altre razze pezzate rosse	17	Italia	Italia	Atrofia ++
84	Limousine	12	Francia	Italia	Normale
85	Limousine	13	Francia	Italia	Normale
86	Limousine	18	Francia	Italia	Atrofia +
87	Limousine	13	Francia	Italia	Normale
88	Limousine	13	Italia	Italia	Normale
89	Meticcio/incrocio	11	Italia	Italia	Normale
90	Limousine	13	Italia	Italia	Normale

I risultati istologici ottenuti secondo i criteri descritti nel capitolo dei “Materiali e Metodi” (negativo, dubbio, sospetto), sia per quanto riguarda i soggetti che i singoli organi bersaglio, sono riassunti nella tabella seguente:

Tabella 6 - Tabella riassuntiva dei soggetti e degli organi bersaglio

	Negativo	Dubbio	Sospetto	Totale
Soggetti	80 (88,9%)	4 (4,4%)	6 (6,7%)	90 (100%)
Timo	80 (88,9%)	4 (4,4%)	6 (6,7%)	90 (100%)
Prostata	50 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	50 (100%)
Bulbo- uretrale	50 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	50 (100%)

Di seguito vengono analizzati i dati ricavati con l'esame istologico per ciascun organo bersaglio esaminato in questo studio (prostata e ghiandola bulbo-uretrale per gli ormoni sessuali, e timo per i corticosteroidi).

- Prostata: l'analisi di 50 prostate non ha messo in evidenza alcun caso sospetto o dubbio ma il 100% di esiti negativi. In particolare, non sono state riscontrate né lesioni riconducibili a trattamento con sostanze estrogene, quali metaplasia squamosa a carico sia dell'epitelio ghiandolare che tubulare, né casi di dilatazione tubulare, ipersecrezione a livello ghiandolare e formazioni di cisti o microcisti dovute all'azione di androgeni. Uno dei campioni negativi è riportato nella figura seguente.

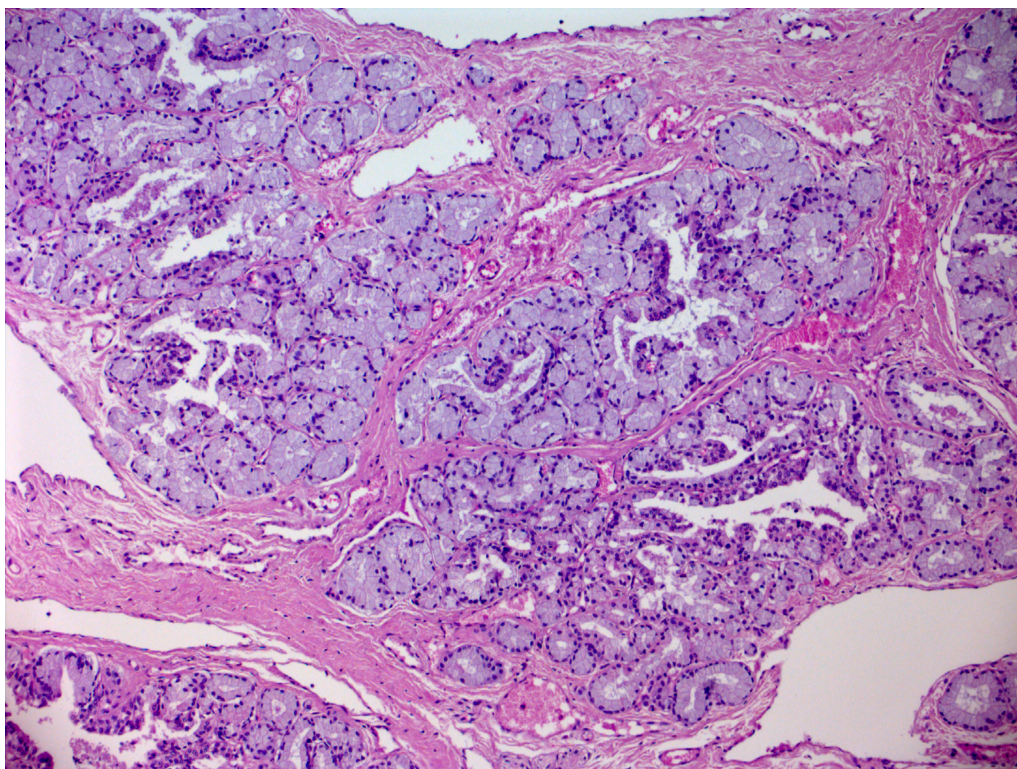


Figura 1. Prostata negativa. EE, 10X

Sul totale delle prostate analizzate (n=50), il 46% (n=23) di esse sono risultate normali, mentre il 54% (n=27) presentava un quadro iperplastico, suddiviso in 42% (n=21) di grado lieve e in 12% (n=6) moderato. Il Piano Nazionale Residui specifica chiaramente che la sola presenza di iperplasia rientra nei casi di esito negativo (PNR 2013). Infatti, studi sperimentali condotti su vitelli maschi al fine di evidenziare le lesioni che compaiono in seguito a trattamento con steroidi

sessuali hanno dimostrato che, nei soggetti appartenenti al gruppo di controllo, può presentarsi iperplasia sia a livello della prostata che delle ghiandole bulbo-uretrali. In particolare, in un'indagine eseguita su vitelli macellati al settimo mese, ripartiti in due gruppi, di cui uno (29 soggetti) trattato nell'ultimo mese di vita con 17 $\beta$ -estradiolo e uno (19 soggetti) di controllo negativo, è stato rilevato all'esame istologico che la prostata dei soggetti trattati presentava una grave metaplasia sia dell'epitelio ghiandolare che dell'uretra prostatica nel 93,1% dei casi (n=27), mentre nei soggetti controllo è stato riscontrato il 26,3% (n=5) di iperplasia prostatica (Bozzetta *et al.*, 2010).

L'assenza di casi sospetti non esclude comunque l'eventualità di un avvenuto trattamento ormonale a scopo anabolizzante. Il motivo risiede nel fatto che gli sviluppi della ricerca scientifica, i cui progressi vengono sfruttati in campo zootecnico, hanno reso possibile l'utilizzo di cocktail anabolizzanti, allo scopo di diminuire la dose di ogni singolo componente. Questo approccio comporta una sempre più difficile identificazione di lesioni specifiche a carico di prostata e ghiandola bulbo-uretrale (Courtheyn *et al.*, 2002).

Degno di nota, anche se esula dal tipo di indagine effettuata, è il rilievo di una percentuale pari al 10% (n=5) dei soggetti esaminati di *Sarcocystis Cruzi* nel muscolo uretrale, che comunque non rappresenta una specie patogena per l'uomo (Pritt *et al.*, 2008).

- Ghiandola bulbo-uretrale: l'analisi delle ghiandole bulbo-uretrali, appartenenti a 50 soggetti maschi, ha evidenziato il 100% di esiti negativi, senza alcun campione dubbio o sospetto. Infatti, come per le prostate, non sono state evidenziate lesioni riferibili all'impiego nei soggetti esaminati di estrogeni (metaplasia squamosa dell'epitelio ghiandolare e duttale) o androgeni (dilatazione tubulare, ipersecrezione e formazione di cisti o microcisti). Uno dei campioni negativi è riportato nella figura seguente.



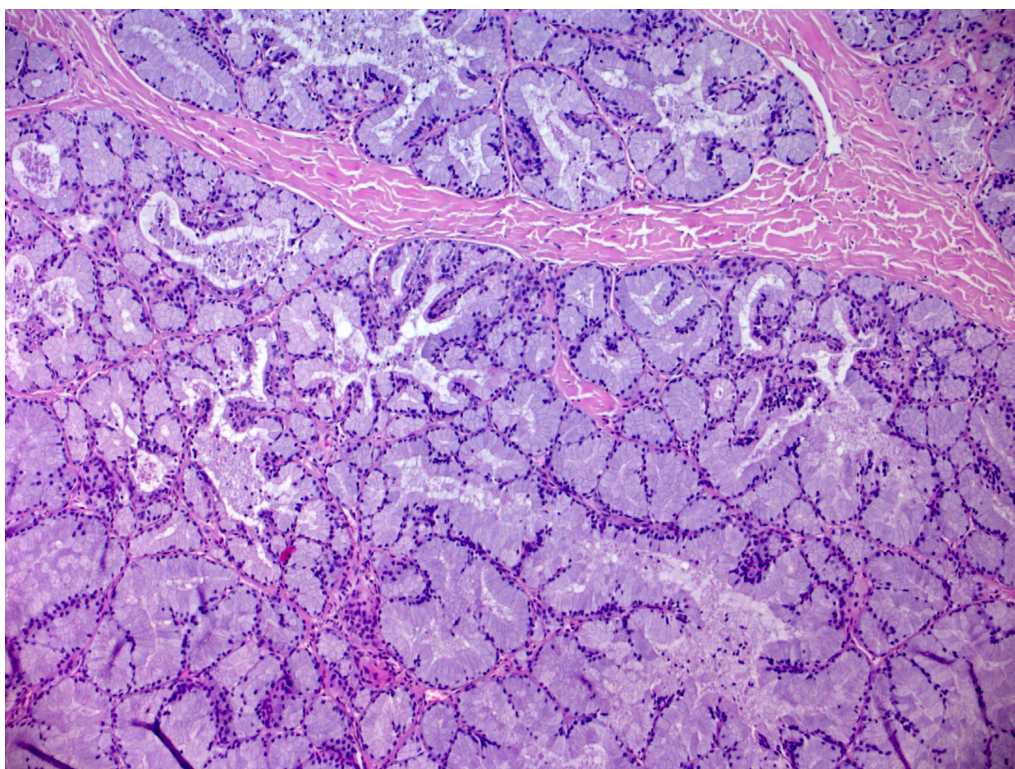


Figura 2. Ghiandola bulbo-uretrale negativa. EE, 10X

Inoltre, similamente a quanto messo in evidenza per le prostate, il 48% (n=24) del totale delle ghiandole analizzate non presentava alcun quadro iperplastico, mentre il 52% (n=26) mostrava iperplasia, percentuale ripartita in 34% (n=17) di grado lieve e 18% (n=9) moderata. Anche in tal caso, l'iperplasia è considerata essere un quadro fisiologico dal Piano Nazionale Residui (PNR 2013) e dimostrato essere talvolta presente anche in vitelli non trattati. Infatti, nello studio di Bozzetta *et al.*, (2010), è stato evidenziato come casi di metaplasia grave abbiano interessato le ghiandole bulbo-uretrali del 93,1% (n=27) dei capi trattati, per quanto riguarda l'epitelio duttale, e dell'89,7% (n=26) per l'epitelio ghiandolare, mentre il 52,6 % (n=10) dei soggetti del gruppo controllo presentava iperplasia ghiandolare e/o dei dotti.

Paragonando i risultati conseguiti in questa tesi con altri studi di monitoraggio mediante esame istologico, effettuati per acquisire dati epidemiologici sull'uso di sostanze anabolizzanti in bovini macellati, possiamo osservare che le percentuali da noi ottenute non rispecchiano, né per la prostata né per la



ghiandola bulbo-uretrale, ad esempio, quelle rilevate in un'indagine condotta da Imbimbo *et al.*, (2012) nel 2009 nella Regione Molise. Infatti, in quest'ultima, è stato riscontrato su 121 prostate, 1 (0,82%) caso sospetto di trattamento con ormoni sessuali, messo in evidenza da iperplasia e ipersecrezione a livello ghiandolare con grave metaplasia dell'uretra prostatica, e ben 38 casi dubbi (31%), caratterizzati da ipersecrezione o lieve metaplasia, e che quindi evidenziavano un quadro tipicamente non fisiologico. Inoltre, per quanto riguarda la ghiandola bulbo-uretrale, analogamente alla nostra indagine, non sono stati rilevati casi sospetti. Tuttavia, 10 (8,2%) ghiandole bulbo-uretrali sono state classificate come dubbie, in quanto presentavano ipersecrezione dell'epitelio ghiandolare (Imbimbo *et al.*, 2012). Prendendo in considerazione studi di monitoraggio meno recenti, la differenza di casi sospetti è ancora maggiore. Infatti, nel 1988 controlli istologici effettuati dai Servizi Veterinari nella Regione Lazio rilevarono una percentuale di prostate sospette pari a 2,4% (n=19 su 782), mentre l'anno seguente tale numero aumentò al 4% (n=24 su 604) (Zottola *et al.*, 1990).

- Timo: come parametri istologici utilizzati per determinare il grado di involuzione timica sono state considerate sia la diminuzione di spessore della corticale, con rarefazione dei linfociti, che l'infiltrazione di cellule adipose nei lobuli timici. L'analisi dei 90 campioni timici, 50 provenienti da bovini maschi e 40 da soggetti femmine, ha rilevato l'88,9% (n=80) di casi negativi, il 4,4% (n=4) di casi dubbi e il 6,7% (n=6) di casi sospetti. Come detto in precedenza, la percentuale di timi sospetti rilevata nei maschi è del 6% (n=3) mentre il 7,5% (n=3) nelle femmine.

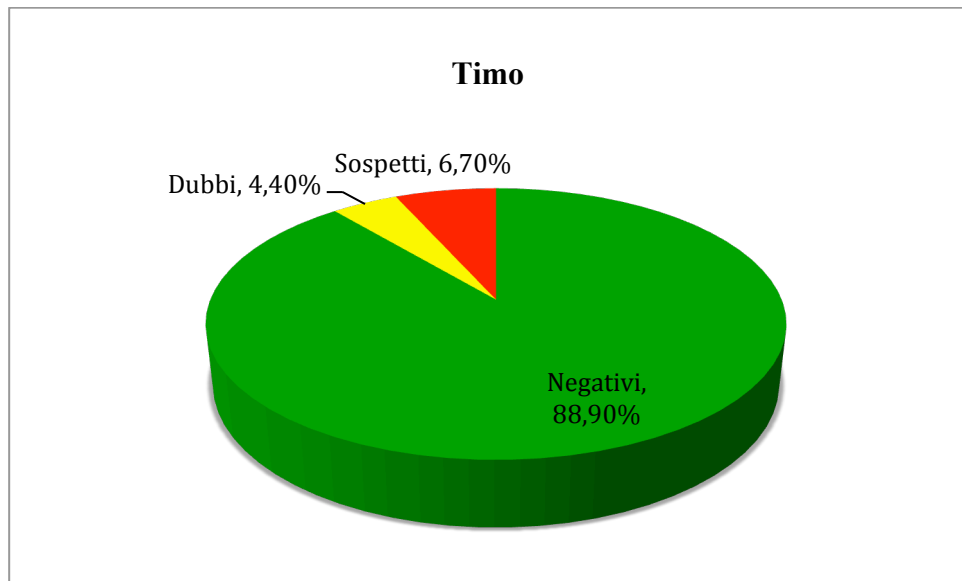


Grafico 4: Risultati timo (%)

Il giudizio “negativo” è stato assegnato a quei campioni di timo che, all’esame istologico, presentavano un aspetto normale, caratterizzato da un’abbondante corticale con presenza di un elevato numero di linfociti e assenza di infiltrazioni adipose, oppure una lieve atrofia del parenchima linfocitario con sostituzione di cellule adipose, anche in considerazione dell’età dell’animale, in quanto tale organo va incontro con il tempo ad un’involuzione fisiologica. Nella figura 3 riportiamo un’immagine del preparato istologico di uno tra gli 80 campioni reputati negativi.

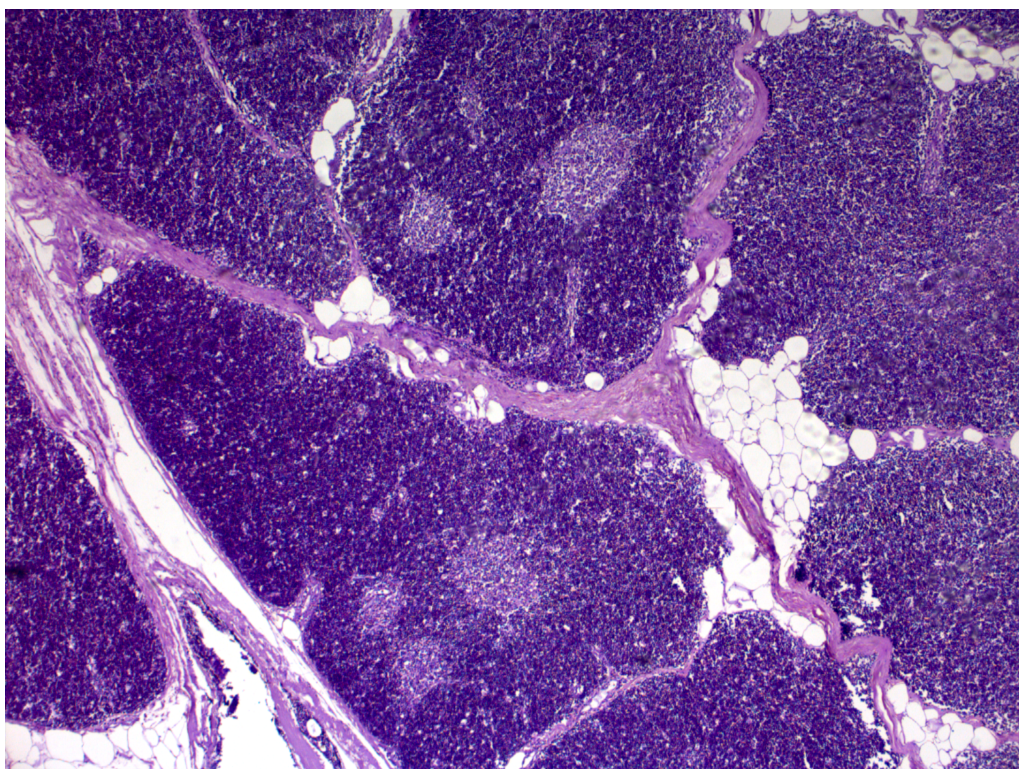


Figura 3. Timo negativo. EE, 5X.

Il giudizio “dubbio” è stato attribuito a quei campioni di timo che mostravano un assottigliamento della corticale con modesta deplezione linfocitaria e moderata infiltrazione adiposa nei setti interlobulari (Figura 4). Le conoscenze attuali non ci consentono di assegnare le lesioni timiche di grado moderato ad un probabile trattamento con corticosteroidi. Infatti, in uno studio sperimentale condotto su vitelloni trattati con desametasone, è stato evidenziato all’esame istologico come una modesta infiltrazione di tessuto adiposo nel timo fosse presente anche nei soggetti del gruppo controllo (Vascellari *et al.*, 2012). Tuttavia, i campioni dubbi mostravano un quadro istologico non tipicamente fisiologico.

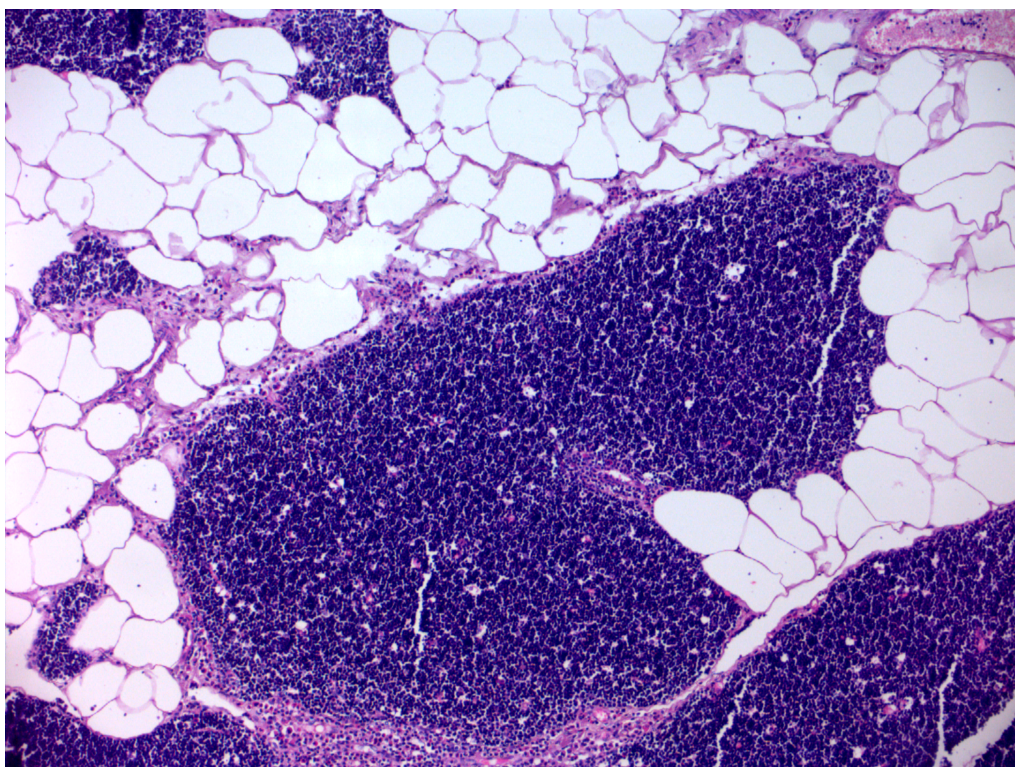


Figura 4. Timo dubbio. EE, 10X

I 6 casi sospetti di trattamento con corticosteroidi rivelavano tutti una marcata atrofia della corticale, che si presentava rarefatta, limitata, diminuita di volume, per la notevole perdita linfocitaria che veniva sostituita totalmente dalla infiltrazione adiposa, per cui rimanevano isole quali residui di lobuli in via di atrofia, circondati da tessuto adiposo. Per tali motivi, l'impressione che il preparato istologico dava, era quello di un "timo invertito", dove la parte midollare era più densa di cellule rispetto alla corticale. In alcuni tratti, le corticali tendevano a ridursi di spessore a tale livello che rimanevano solo pochi elementi linfocitari. Diminuzione degli elementi linfocitari è stata osservata anche nella midollare. Rispetto ai campioni considerati "dubbi", era più evidente l'infiltrazione di adipociti che interessava non solo i setti interlobulari, ma anche le corticali e le midollari. In figura 5 è riportato un esempio delle gravi alterazioni riscontrate a livello del timo. In particolare, il preparato istologico proviene da una maschio di 14 mesi che alla lettura riportava un quadro di grave atrofia del parenchima timico con deplezione linfocitaria e deposito di tessuto adiposo. Tale fenomeno è più evidente a livello della corticale la quale si



assottiglia progressivamente a partire dalla periferia sino alla midollare. Questo quadro istopatologico, senza una dichiarazione di trattamento farmacologico a scopo terapeutico, rappresenta un forte indicatore di trattamento illecito con corticosteroidi, nel cui caso si può comprendere come questi animali siano maggiormente predisposti a contrarre patologie infettive per una limitata produzione di antigeni timo-dipendenti con conseguente blocco delle difese immunitarie (Guarda *et al.*, 1983).

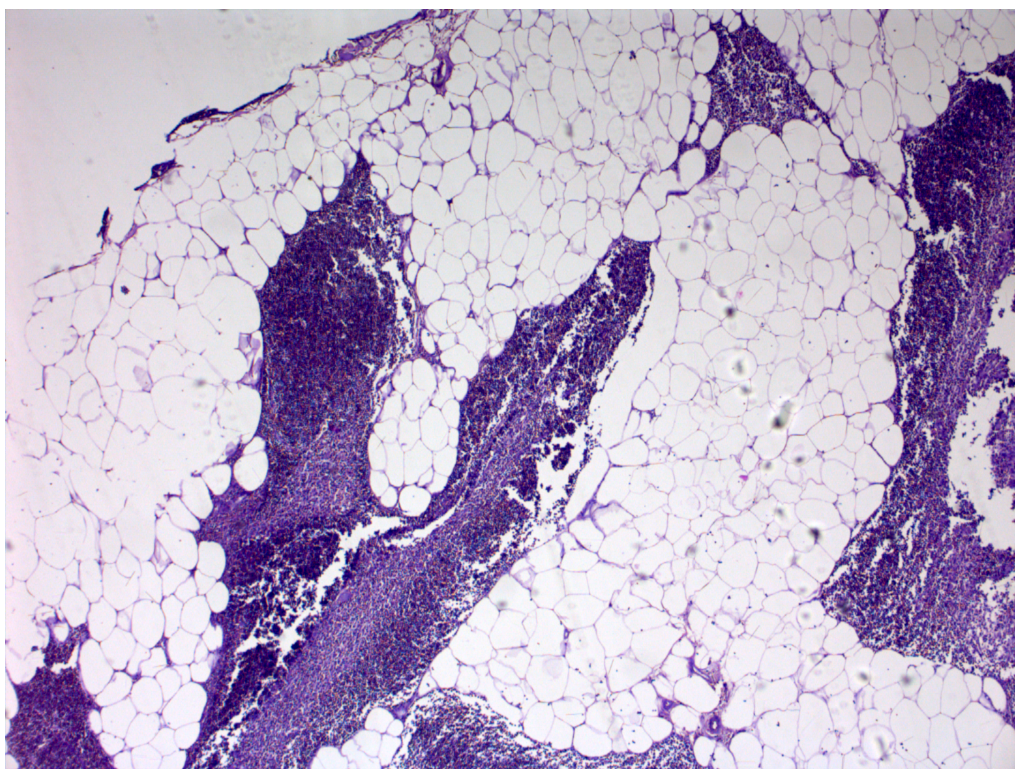


Figura 5. Timo sospetto. EE, 5X

Come detto in precedenza, gli unici dati certi per l'identificazione di soggetti con involuzione timica, si sono rivelati la diminuzione della corticale con rarefazione dei linfociti e l'infiltrazione di adipociti. I reperti sospetti rilevati sono sovrapponibili a quelli descritti da Guarda *et al.*, (1983, 1985) e da Canese *et al.*, (1985), da Biolatti *et al.*, (2005) e da Vascellari *et al.*, (2012) in vitelli trattati con glicocorticoidi. Modificazioni simili sono state descritte anche nell'uomo durante l'involuzione fisiologica del timo (Steinmann, 1986). Ricordiamo, infatti, che la somministrazione di cortisonici, oltre ad avere notevoli effetti positivi (a bassi dosaggi e per lunghi periodi) sull'accrescimento

degli animali e sulla qualità della carne, determina un'atrofia più o meno marcata del timo, con deplezione linfocitaria e graduale deposito di tessuto adiposo. Ad esempio, in uno studio condotto su vitelli a carne bianca trattati con desametasone (uno dei cortisonici maggiormente impiegati in modo illecito nell'allevamento del bovino da carne come promotore di crescita), sia secondo un dosaggio terapeutico (due somministrazioni per via intramuscolare di 15 µg/kg a distanza di una settimana) che anabolizzante (0,4 mg al giorno per os per 23 giorni), è stato osservato che all'esame istologico il timo presentava una notevole deplezione linfocitaria con sostituzione adiposa. Tale quadro non consentiva una distinzione netta del protocollo di trattamento utilizzato (terapeutico o anabolizzante) (Biolatti *et al.*, 2005).

D'altro canto, è anche possibile affermare che l'atrofia del timo potrebbe essere la conseguenza di malattie infettive, tossicosi croniche e situazioni di stress prolungato (Gruver e Sempowski, 2008). Tuttavia, in questi casi, gli animali dovrebbero mostrare segni clinici e altre lesioni tipiche di tali patologie (Heilmann *et al.*, 1982; Panebianco e Macrì, 1988; Durchfeld *et al.*, 1989; Uno *et al.*, 1990). Al contrario, nella nostra indagine non sono state rilevate alterazioni cliniche e anatomo-patologiche ad altri organi. Il fatto che all'atrofia timica non si associno altre lesioni degli organi immunocompetenti, può essere dovuto ad un equilibrato impiego di promotori di crescita, mentre nel caso di trattamenti anabolizzanti o farmacologici a scopo terapeutico non equilibrati e protratti nel tempo, come ad esempio la somministrazione a dosi elevate e per lungo termine di glicocorticoidi, si può verificare depressione della sintesi anticorpale (Panebianco e Macrì, 1988). Altre possibili cause in grado di indurre atrofia del timo, con riduzione simmetrica delle aree corticali e midollari, sono fenomeni autoimmuni e sindrome da immunodeficienza (Valli, 2007). Inoltre, la valutazione dell'atrofia timica, ad un'osservazione anatomo-istopatologica, potrebbe essere influenzata anche dal fatto che nei bovini da carne è piuttosto difficile distinguere tra involuzione fisiologica del timo e atrofia da trattamento (specialmente nei soggetti adulti) (Vascellari *et al.*, 2012), oltre che da variazioni soggettive inter-osservatore (Biolatti *et al.*, 2005; Cannizzo *et al.*, 2008).

All'esame istologico si possono rilevare possibili falsi positivi per pregressa terapia cortisonica (Biolatti *et al.*, 2005; Cannizzo *et al.*, 2008), anche se nel

nostro caso la Dichiarazione per il macello non evidenziava alcun trattamento farmacologico recente.

Infine, è stato dimostrato che nel vitello a carne bianca, l'atrofia timica regredisce velocemente al termine del trattamento, sia esso terapeutico o anabolizzante, e che l'organo mostra una rigenerazione completa a distanza, rispettivamente, di 25 e 11 giorni dall'ultima somministrazione (Biolatti *et al.*, 2005).

Alla lettura dei preparati istologici non sono stati osservati fenomeni necrotici a carico dei linfociti a conferma di quanto prospettato da Canese *et al.*, (1985), da Rosmini *et al.*, (1987) e da Panebianco e Macrì (1988), ovvero che l'atrofia timica di vitelli normalmente macellati o indotta da trattamenti con glicocorticoidi sia dovuta ad abbandono del timo da parte dei linfociti, piuttosto che ad una loro necrosi.

La legislazione vigente (D. Lgs. 158/2006, modificato dal D. Lgs 148/2009) prevede l'esecuzione di indagini sistematiche, sia in allevamento che al macello, volte ad individuare l'utilizzo di sostanze vietate o l'uso illecito di quelle consentite esclusivamente per scopi terapeutici.

La percentuale di campioni sospetti da noi ottenuta è la stessa di quella rilevata nel corso di un progetto pilota promosso dal Ministero della Salute in otto Regioni nel periodo 2004-2006, nel quale l'esame istologico di organi bersaglio di 295 vitelli a carne bianca e 1035 vitelloni da carne evidenziò una percentuale di campioni sospetti per la sola categoria dei cortisonici pari a 6,7%. Invece, i risultati conseguiti in questa tesi, qualora fossero confermati, non rispecchierebbero in modo evidente i dati ottenuti annualmente dal PNR per quanto riguarda le non conformità alle analisi chimiche nei bovini. Infatti, mentre nei PNR 2009, 2010, 2011 le percentuali dei campioni non conformi per tale categoria di animali sono state, rispettivamente, 0,22%, 0,27% e 0,27% (la maggior parte per la categoria A3 degli steroidi), la percentuale di casi sospetti per corticosteroidi da noi rilevata suggerisce una buona probabilità che il problema dei trattamenti illeciti con sostanze ormonali sia di portata maggiore di quanto evidenziato dai casi di positività rilevati dai controlli ufficiali con metodi chimici, gli unici comunque ad avere valenza giuridico-legale. Le cause di questa discrepanza sono da ricercare soprattutto nelle mutate strategie di trattamento adottate dagli allevatori, capaci di limitare notevolmente l'efficacia

dei controlli ufficiali, basati unicamente sulla messa in evidenza dei composti ricercati per mezzo di analisi chimiche. Si tratta dell'utilizzo di combinazioni di diversi composti (*cocktails*), a dosaggi molto bassi, ad azione analoga o sinergica (consentono di ottenere importanti risultati zootecnici, diminuendo la concentrazione relativa di ogni singola molecola, e di conseguenza, anche quella di eventuali residui), dell'uso di sostanze che vanno incontro ad una rapida metabolizzazione ed eliminazione, e dell'impiego di molecole diverse o comunque modificate rispetto a quelle che vengono ricercate nelle analisi ufficiali (Biolatti *et al.*, 2003). Inoltre, l'uso di diverse molecole a basso dosaggio, con effetti sinergici, provocando alterazioni tissutali solo minime, ostacola anche il rilievo mediante l'esame istologico di lesioni sospette negli organi bersaglio (Courtheyn *et al.*, 2002; Biolatti *et al.*, 2005).

Tuttavia i dati da noi rilevati sono notevolmente inferiori rispetto a quanto dichiarato in una recente intervista dalla responsabile del Centro Nazionale di riferimento sugli anabolizzanti Elena Bozzetta: "Se a livello europeo la media di casi positivi riscontrati con le analisi chimiche è dello 0,2%, i monitoraggi eseguiti in Italia con metodo istologico fanno salire questo dato al 15%" ([www.ilfattoalimentare.it](http://www.ilfattoalimentare.it)). A conferma di ciò, nell'indagine condotta nel Molise, in precedenza citata, è stata evidenziata una percentuale di soggetti sospetti pari al 15,3% (n=22 su 144 bovini campionati) (Imbimbo *et al.*, 2012).

In conclusione, l'esame anatomo-istopatologico del timo, potendo il suo aspetto esser messo in relazione con trattamenti ormonali illeciti, oltre che con tossicosi croniche, stress e malattie infettive, può fornire al veterinario ispettore elementi di sospetto da utilizzare nei casi in cui occorra effettuare campionamenti per la ricerca di residui ormonali nelle carni, nonostante le analisi chimiche di conferma nella grande maggioranza dei casi non abbiano trovato residui nelle carni di vitello con atrofia timica.



## 7. CONCLUSIONI

I risultati di questo lavoro suggeriscono come il problema dei trattamenti illeciti con sostanze ormonali, nonostante una rigida legislazione a riguardo e l'attuazione del Piano Nazionale Residui, sia maggiore di quanto evidenziato dai casi di positività rilevati dai controlli ufficiali mediante analisi chimiche, le uniche, a tutt'oggi, ad avere valore legale. Infatti, per poter esprimere un parere di positività è necessario identificare inequivocabilmente la molecola responsabile dell'alterazione nei tessuti o nelle matrici biologiche dell'animale oggetto di indagine.

Tuttavia, se alcune alterazioni istologiche provocate dai trattamenti ormonali a carico degli organi bersaglio permangono per un tempo abbastanza lungo da essere svelate al momento della macellazione, le analisi chimiche di conferma utilizzabili ad oggi possono non essere sufficientemente sensibili per il rilevamento delle sostanze illecite utilizzate. In ogni caso, la legislazione vigente, in caso di sospetto trattamento illecito, prevede la disposizione di ulteriori controlli analitici, a sondaggio, sugli animali presenti in azienda, sugli alimenti a loro destinati e sull'acqua di abbeveraggio.

Il test istologico rappresenta, comunque, un utile strumento di screening che, pur non avendo valore diagnostico, potrebbe consentire di orientare in modo più efficace ulteriori indagini per la ricerca di comportamenti fraudolenti da parte di alcuni allevatori e fornire un panorama più veritiero della realtà relativa ai trattamenti fraudolenti in campo zootecnico, conferendo maggiori livelli di consapevolezza nelle istituzioni e negli Organi ufficiali, ed evidenziando la necessità di elaborare piani più efficaci per la prevenzione del fenomeno stesso, allo scopo di garantire una maggior tutela del consumatore.

## 8. BIBLIOGRAFIA:

1. Abraham G., Gottschalk J., Ungemach F.R.(2004). Possible role of dexamethasone in sensitizing the beta-2-adrenergic receptor system in vivo in calves during concomitant treatment with clenbuterol. *Pharmacology*, 72: 196-204.
2. Aguggini A., Beghelli V., Clement M. G., d'Angelo A., Benedetti A., Focello C., Giulio L. F., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R., (1998). "Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia". UTET, Torino.
3. Anderson B.H., Watson D.L., Colditz I.G. (1999). The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Veterinary Research Communication*, 23: 399-413.
4. Antignac J.P., Brosseaud A., Gaudin-Hirret I., André F., Bizec B.L., (2005). Analytical strategies for the direct mass spectrometric analysis of steroid and corticosteroid phase II metabolites. *Steroids*, 70: 205-216.
5. Arts C.J.M., Van Baak M.J., Den Hartog J.M.P. (1991). Control system of the illegal use of naturally occurring steroids in calves. *Journal of Chromatography*, 546, 429-444.
6. Attucci A. (2011). Illeciti trattamenti negli animali da allevamento: conseguenze sulla salute del consumatore e sul benessere animale. Servizio Veterinario Igiene degli Allevamenti e delle Produzioni zootecniche-ASL CN1.
7. Ballarini G. (1990). I  $\beta$ -agonisti nell'allevamento da carne. Atti del Corso di Perfezionamento su "Tecnologie e Biotecnologie Avanzate in Medicina Veterinaria"- Università di Parma, 170.
8. Barbarino G. (1996). Primo caso di intossicazione collettiva da  $\beta$ -agonisti ufficialmente denunciato in Italia. *Med. Veter. Preventiva*, 10: 4.
9. Barbosa J., Cruz C., Martins J., Silva J.M., Neves C., Alves C., Ramos F., Da Silvera M.I.N. (2005). Food poisoning by clenbuterol in Portugal. *Food Add Contam.* 22: 563-566.
10. Biolatti B., Bollo E., Appino S., Amedeo S., Guarda F., Tartari E. Benatti G. (1992). Somministrazione cronica di clenbuterolo in vitelli a carne bianca. Aspetti anatomo-patologici. *Atti Soc. It. di Buiatria*. V. 24 p. 319-325.

11. Biolatti B., Cabassi E., Rosmini R., Groot M., Castagnaro M., Benevelli R., Gilioli G., Ghizzinardi A., Giorgi P., Mazzini C., Comellini F., Alberghini L., Zancanaro G., Cannizzo T., Amedeo S., Poppi L., Cantoni A.M. (2003). Lo screening istologico nella prevenzione dell'uso di anabolizzanti nel bovino. *Large Animals Review* 9(2): 9-19.
12. Biolatti B., Bollo E, Cannizzo F. T., Zancanaro G., Tarantola M., Dacasto M., Cantiello M., Carletti M., Biolatti P. G., Barbarino G. ( 2005). Effects of low-dose dexamethasone on thymus morphology and immunological parameters in veal calves. *Journal of Veterinary Medicine. A* 52, 202- 208.
13. Biolatti B. (2009). Lesioni indotte dai promotori di crescita illeciti negli animali da carne. In: *Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali*, Ed. Nebbia C., 321-353, EdiSES, Napoli.
14. Boccuzzi G. (1990). Effetti sull'uomo degli ormoni e degli anabolizzanti usati in zootecnia e presenti nella catena alimentare. *Atti Corso di Aggiornamento per Medici Veterinari operatori di Sanità Pubblica Ufficiali di Polizia Giudiziaria*. Rovigo, 137.
15. Bozzetta E., Pezzolato M., Maurelle C., Varello K., Capra P., Meloni D., Bellino C., Borlatto L., Caramelli M. (2010). L'istologia come metodo di screening per il rilievo di trattamento illecito con estrogeni nei vitelli. *Large Animals Review*, 16, 107-111.
16. Brambilla G., Loizzo A., Fontana L., Strozzi M., Guardino A., Soprano V. (1997). Food poisoning following consumption of clenbuterol-treated veal in Italy. *J Am Med Assoc*, 278: 635.
17. Brambilla G., Cenci T., Franconi F., Galarini R., Macrì A., Rondoni F., Strozzi M., Loizzo A. (2000). Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicol Lett*, 114: 47-53.
18. Cabassi E. (1990). Nuovi aspetti di manipolazione del metabolismo: il caso dei  $\beta$ -agonisti su alcune modificazioni morfofunzionali degli animali domestici. *Atti del Corso di Perfezionamento su "Tecnologie e Biotecnologie Avanzate in Medicina Veterinaria"*- Università di Parma, 176.
19. Canese M.G., Guarda F., Pancani I., Leonardo E., Bianco S. (1985). Involuzione timica nel vitello indotta da desametasone. *Summa*, 2, 275.

20. Cannizzo F.T., Miniscalco B., Riondato F., Bollo E., Barbarino G., Giorgi P., Mazzini C., Biolatti B. (2008). Effects of anabolic and therapeutic doses of dexamethasone on thymus morphology and apoptosis in veal calves. *Veterinary Record*, 163: 448-452.
21. Caroli S. (2002). La rete dei laboratori comunitari e nazionali di riferimento per i residui. *Annali Istituto Superiore di Sanità*, 38 (1), 69-76.
22. Castigliego L., Grifoni G., Rosati R., Iannone G., Armani A., Gianfaldoni D., Guidi A. (2009). On the alterations in serum concentration of somatotropin and insuline-like growth factor 1 in lactating cows after the treatment with a little studied recombinant bovine somatotropin *Research in Veterinary Science* 87, 29–35.
23. Catellani G. (1984). L'impiego illecito dei tireostatici nell'allevamento bovino. *Obiettivi Vet.*, V. 5, p. 31-36.
24. Cavalieri E. L., Rogan, E. G. (1998). Mechanisms of tumor initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons in mammals. In *The Handbook of Environmental Chemistry*. (Neilson, A. H., ed.). pp. 81–117, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
25. Cini C., Carosi M., Figà-Talamanca I. (2006). Residui negli alimenti: i rischi per la salute umana. *Dossier Metes Salute e Sicurezza*.
26. Corah T., Tatum J., Morgan J., Mortimer R., Smith G. (1995). Effects of a dexamethasone implant on deposition of intramuscular fat in genetically identical cattle. *Journal of Animal Science*, 73: 3310-3316.
27. Courtheyn D., Le Bizec B., Brambilla G., De Brabander H.F., Cobbaert E., Van de Wiele M., Vercammen J., De Wasch K. (2002). Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Analytica Chimica Acta* 473: 71–82.
28. De Wasch K., De Brabander H., Courtheyn D. (1998). Detection of corticosteroids in injection sites and cocktails by MSn. *Analyst*, 123: 2409-2414.
29. De Wasch K., De Brabander H.F., Courtheyn D., Impens S., Vandewiele M. (2001). Determination of mercaptobenzimidazol and other thyreostat residues in thyroid tissue and meat using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 912: 311–317.
30. Durchfeld B., Kaufer-Weiss I., Weiss E. (1989). Accidental thymus involution in calves. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 102: 400-405.

31. Ferguson D.C., Hoenig M. (1995). Glucocorticoids, mineralcorticoids and steroid synthesis inhibitors. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Ed. Adams H.R., 7th ed., 622-637, Iowa State University Press, Ames, IA.
32. Ferranti C., Palleschi L. (2011). Istituto Superiore di Sanità. Corso: Le disposizioni in materia di sicurezza alimentare applicate ai Laboratori Accreditati. 15-16 novembre 2011, organizzato da Istituto Superiore di Sanità e Accredia.
33. Ferrero G., Perlo P., Valpreda M. (1989). Anabolizzanti e salute. Aspetti tecnici e giuridici del loro impiego negli allevamenti. Editore Maggioli.
34. Fiems L.O. (1987). Effects of  $\beta$ -adrenergic agonists in animal production and their mode of action. Ann. Zootech., 36, 271.
35. Galarini R., Antonini C. (2006). Il Piano Nazionale Residui: origine, scopi ed evoluzione. [www.spvet.it](http://www.spvet.it), Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Webzine di Sanità Pubblica Veterinaria, 38, novembre 2006.
36. Girolami F., Donalisio C., Tagliante M., Gatto S., Bertarelli D., Balbo A., Carletti M., Gardini G., Barbarino G., Nebbia C. (2010). Illicit use of dexamethasone in meat cattle: rationale. Effects on treated animals, and traditional and innovative diagnostic techniques. Large Animal Review Volume 16, 3: 113-124.
37. Gottardo F., Brscic M., Pozza G., Ossensi C., Contiero B., Marina A., Cozzi G. (2008). Administration of dexamethasone per os in finishing bulls. I. Effects on productive traits, meat quality and cattle behaviour as indicator of welfare. Animal 2: 1073-1079.
38. Greco D., Stabenfeldt G.H. (2002). Endocrinology. In: Textbook of Veterinary Physiology, Ed. Cunningham J.G., 3rd ed., 323-372, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
39. Gruver A.L., Sempowski G.D. (2008). Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. J. Leukoc. Biol. 84: 915-923.
40. Guarda F., Valenza F., Biolatti B., Quaglia F., Emanuel C. (1983). Sull'atrofia precoce del timo in seguito a somministrazione prolungata di glicocorticoidi nei vitelli sanati. Il nuovo Progresso Vet., 38, 434.
41. Guarda F., Canese M.G., Pancani I., Bianco S. (1985). Alterazioni timiche precoci nel vitello dopo trattamento con glicocorticoidi: tecniche chirurgiche per

- i prelievi biotici seriati e ricerche istologiche. Atti Soc. It. Buiatria, 17, 717-720.
42. Guarda F. Biolatti B., Valenza F., Miglietti M. (1988). Correlazioni anatomo-patologiche tra lesioni del timo e dell'apparato genitale femminile di vitelli a carne bianca regolarmente macellati. Atti Soc. It. Buiatria, 20, 473-480.
  43. Guidi E. (2009): Rischio chimico da diossine. Eurocarni, 2, 20.
  44. Hafez E.S.E. (1984). Biologia e tecnologia della riproduzione nelle specie animali di interesse zootecnico. Editoriale Grasso.
  45. Heilmann P., Steinbach G., Schulze F. (1982). Pathoanatomical and pathohistological studies of cyclophosphamide-induced organ changes in calves with special reference to lymphatic organs. Arch. Exp. Veterinarmed. 36: 623-633.
  46. Herbst A.L., Scully R.E. (1970). Adenocarcinoma of the vagina in adolescence. A report of 7 cases including 6 clear-cell carcinomas (so-called mesonephromas). Cancer 25(4): 745-57.
  47. International Agency for research on Cancer, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. (1987)
  48. Imbimbo P., Castiglione L., Armani A., Biolatti B., Cannizzo F.T., Gianfaldoni D., Guidi A. (2012). A histologic study on growth promoter target organs of slaughtered beef in molise region (Italy). J Vet Med Sci., 74(10):1253- 1259.
  49. Johnson R., Hanrahan C.E. (2010). The U.S.-EU Beef Hormone Dispute. Congressional Research Service (6 dicembre 2010), pp: 1-35.
  50. Klein I., Parveen G., Gavalier J.S., Vanthiel D.H. (1982). Colonic polyps in patients with acromegaly. Ann. Int. Med., 97, 27-30.
  51. Kuiper H.A., Noordam M.Y., Van Dooren-Flipsen M.M.H., et al. (1998). Illegal use of b-adrenergic agonists: European Community. J. Anim. Sci, 76: 195-207.
  52. Lodetti E. (1989). Impiego dei  $\beta$ -agonisti negli allevamenti zootecnici. Selezione Veterinaria, XXX. 10, 1485.
  53. Lone KP. (1997). Natural sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues methods and epidemiology. Critical Rev Food Sci Nutr, 37: 93-209.
  54. Matano Y., Okada T., Suzuki A., Yoneda T., Takeda Y., Mabuchi H. (2005). Risk of colorectal neoplasm in patients with acromegaly and its relationship

- with serum growth hormone levels. *Am J Gastroenterol*; 100: 1154-60.
55. Meyer HH. (2001). Biochemistry and physiology of anabolic hormones used for improvement of meat production. *APMIS*, 109: 1-8.
56. Nebbia C. Corticosteroidi. (2009). In: *Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali*, Ed. Nebbia C., 285-295, EdiSES, Napoli.
57. Nielen, M.W.F.; Lasaroms, J.P.; Essers, M.L.; Sanders, M.B.; Heskamp, H.H.; Bovee, T.F.H.; Van Rhijn, J.; Groot, M.J. (2007). The ultimate veal calf reference experiment: hormone residue analysis data obtained by gas and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 586, 30-34.
58. Pace V., Settineri D. (1996). L'impiego degli ormoni nell'alimentazione animale: un problema aperto. *Informatore Agrario* 46: 47-51.
59. Page GA. (1998). Agricultural Chemicals. In *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety*, Fourth Ed. ILO, Geneva, Stellman Jeanne Mager Ed.
60. Palliola E., Moretti G., Nanni A., Amici M., Rossi C. (1987). Valutazione degli esami istologico, ponderale e chimico sulle tiroidi dei bovini quali elementi per il controllo del trattamento illegale con tireostatici. *Ann. Ist. Super. Sanità*. Vol. 23, N. 1: 129-134.
61. Panebianco A., Macrì B. (1988). Studio anatomo-istopatologico sul sistema immunocompetente di vitelli normalmente macellati. Considerazioni ispettive. *Atti. S.I.B.*, 20, 745-753.
62. Pines A., Rozen M.B., Gilat T. (1985). Gastrointestinal tumors in acromegalic patients. *Am J Gastroenterol* 80: 286-289.
63. PNR (2007): Piano Nazionale per la ricerca dei Residui negli animali e nei prodotti di origine animale. Anno 2007. Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione Ufficio III.
64. PNR (2008): Piano Nazionale per la ricerca dei Residui negli animali e nei prodotti di origine animale. Anno 2008. Ministero della Salute, Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti, Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione Ufficio III.
65. PNR (2012): Piano Nazionale per la ricerca dei Residui ai sensi del D. Lgs. n. 158 del 16 aprile 2006. Anno 2012. Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli

Alimenti e la Nutrizione.

66. PNR (2013): Nazionale per la ricerca dei Residui ai sensi del D. Lgs. n. 158 del 16 aprile 2006. Anno 2013. Ministro della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione.
67. Preziuso F., Preziuso S. (1999). Lezioni ed appunti in endocrinologia veterinaria. Servizio Editoriale Universitario di Pisa.
68. Pritt B., Trainer T., Simmons-Arnold L., Evans M., Dunams D., Rosenthal B.M. (2008). Detection of sarcocystis parasites in retail beef: a regional survey combining histological and genetic detection methods. *J Food Prot.*, 71(10):2144-7.
69. Pulce C., Lamaison, D., Keck, G., Bostvironnois, C., Nicolas, J., Descotes, J.J., Moora, M., Colmant, A. (1991). Intoxication alimentaire collective due à la présence de résidus de Clenbuterol dans du foie de veau. *BEH* 5, 17–18.
70. Re G., Badino P., Dacasto M., Farca A.M., Girardi C., Tartari E., Benatti G. (1992). Effetti del clenbuterolo nel vitello a carne bianca. *Atti Soc. It. di Buiatria*. V. 24 p. 311-317.
71. Rico A.G. (1983). Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle. *J. Anim. Sci.*, 57, (1), 226-32.
72. Rosmini R., Marcato P.S., Marocchio L. (1987). Aggiornamento interpretativo dei reperti istologici nella prostata e nella ghiandola di Bartolino di vitelli macellati. *Praxis*, 3, 8.
73. Rosmini R., Marocchio L., Patrassi F. (1987). L'esame anatomo-istopatologico del timo di vitelli regolarmente macellati. *Atti S.I.B.* 19, 555-561.
74. SANCO/2004/2726 rev4-December 2008. Guidelines for implementation of Decision 2002/657/Ec. European Commission- Health and Consumer Protection Directorate-General.
75. Schumacher SB, Van den hauwe O, Van Peteghem C and Naegeli H. (2003). Development of a dual luciferase reporter screening assay for the detection of synthetic glucocorticoids in animal tissues. *Analyst*, 128: 1406-1412.
76. Scippo M., Gaspar P., Degand G., Maghuin-Rogister G. (1993). Control of the illegal administration of natural steroid hormones in urine and tissues of veal calves and in plasma of bulls. *Analytica Chimica Acta*, 275; 57-74.



77. Silvan G., Martínez-Mateos M.M., Blass A., Camacho L., Gonzales-Gil A., Garcia-Partida P., Illera J.C. (2007). The effect of long-term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats: part 1: Endocrine adrenal function. *Analytica Chimica Acta*, 586: 246-251.
78. Simontacchi C, Perez de Altamirano T, Marinelli L, Angeletti R, Gabai G. (2004). "Plasma steroid variations in bull calves repeatedly treated with testosterone, nortestosterone and oestradiol administered alone or in combination". *Vet Res Commun*. 28(6):467-77.
79. Smith DJ. (1998). The Pharmacokinetics, Metabolism and Tissue Residues of  $\beta$ -Adrenergic Agonist in Livestock. *J Anim Sci*, 76: 173-194.
80. Soprano V., Grasso L., Esposito M., Oliviero G., Brambilla G., Loizzo A. Clenbuterol residues in non-liver containing meat as a cause of collective food poisoning. *Vet Human Toxicol*, 1998, 40: 141-143.
81. Steinmann G.G. (1986). In "Pulmonary diseases". Ed. H.K. Muller-Hermelink, Springer-Verlag, Berlin.
82. Swenson M.J, Reece W.O. (2002). *Fisiologia degli animali domestici*. Gruppo Editoriale Idelson-Gnocchi.
83. Tarantola M., Schiavone A., Preziuso G., Russo C., Biolatti B., Bergero D. (2004). Effects of low doses of dexamethasone on productive traits and meat quality of veal calves. *Animal Science*, 79: 93-98.
84. UNI CEI EN ISO/IEC 17025 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura. (2000). UNI-CEI, Milano (Italy).
85. Uno K., Takesue K., Nakanisi K., Nagasawa K., Murakami K., Homma S. (1990). Thymuses atrophy in calves associated with infectious diseases. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 43: 655-660.
86. Valli VEO (2007)- Hematopoietic system. In Jubb, Kennedy, and Palmer's *Pathology of domestic animals*. 5th edition. Edited by Maxie MG. Elsevier, Amsterdam; 107-324.
87. Van den Hauwe O., Schneider M., Sahin A., Van Peteghem C.H., Naegeli H. (2003). Immunochemical screening and liquid chromatographic-tandem mass spectrometric confirmation of drug residues in edible tissues of calves injected with a therapeutic dose of the synthetic glucocorticoids Dexamethasone and Flumethasone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 326-330.

88. Vascellari M., Capello K., Stefani A., Biancotto G., Moro L., Stella R., Pozza G., Mutinelli F. (2012). Evaluation of thymus morphology and serum cortisol concentration as indirect biomarkers to detect low-dose dexamethasone illegal treatment in beef cattle. *BMC Vet Res.* 3;8:129.
89. Vincenti M., Girolami F., Capra P., Pazza M., Carletti M., Gardini G., Nebbia C. (2009). Study of Dexamethasone urinary excretion profile in cattle by LC-MS/MS: comparison between therapeutic and growth-promoting administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1299-1306.
90. Zottola T., Saccares S., Bilei S., Fontanelli G. (1990). Andamento dei controlli istologici nelle province del Lazio sulle prostate e ghiandole del Bartolino di bovini nel biennio 1988/1989. *Atti S.I.B.*, 22, 623-630.

## **RIFERIMENTI NORMATIVI:**

1. Legge 3 febbraio 1961, n. 4: “Divieto dell'impiego degli estrogeni come fattori di crescita o di neutralizzazione sessuale negli animali le cui carni e prodotti sono destinati all'alimentazione umana”.
2. Decreto Ministeriale de 15 gennaio 1969: “Divieto per gli allevatori di detenere o somministrare agli animali sostanze ad attività ormonale ed antiormonale”.
3. Direttiva 81/602/ CEE del Consiglio, del 31 luglio 1981, concernente il divieto di talune sostanze ad azione ormonica e delle sostanze ad azione tireostatica. G.U.C.E. 7 Agosto 1981 n. L 222. Recepita in Italia con il Decreto Ministeriale 3 novembre 1981: “ Divieto di vendita di medicinali (specialità di medicinali o galenici) per uso veterinario contenenti stilbenici e tireostatici”.
4. Direttiva 86/469/CEE del Consiglio, del 16 settembre 1986, relativa alla ricerca di residui negli animali e nelle carni fresche.
5. Direttiva 96/22/CE del Consiglio del 29 aprile 1996: “concernente il divieto d'utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze  $\beta$ -agoniste nelle produzioni animali e che abroga le direttive 81/602/CEE, 88/146/CEE e 88/299/CEE”. (GU L 125 del 23.5.1996, pag. 3). Modificata dalle Direttive 2003/74/CE e 2008/97/CE.
6. Direttiva 96/23/CE del Consiglio del 29 aprile 1996: “concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro

- prodotti e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE”. (GU L 125 del 23.5.1996, pag. 10)
7. Decreto Legislativo n. 336 del 4 agosto 1999: “Attuazione delle direttive 96/22/CE e 96/23/CE concernenti il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni di animali e le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti”. G.U.C.E. 30 Settembre n. L 230.
  8. D.M. 14 novembre 1996. Determinazione dei livelli fisiologici massimi degli ormoni sessuali di natura endogena estradiolo 17 beta, progesterone e testosterone nel siero o nel plasma di sangue bovino. (pubbl. in *Gazz. Uff.* n. 24 del 30 gennaio 1997).
  9. 98/179/CE: Decisione della Commissione del 23 febbraio 1998 recante modalità d'applicazione per il prelievo ufficiale di campioni al fine della sorveglianza su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei prodotti di origine animale.
  10. Direttiva 93/99/CEE del Consiglio, del 29 ottobre 1993, riguardante misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari. Recepita con il D.Lgs.26/05/1997, n.156. Attuazione della Direttiva 93/99/CE concernente misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari.
  11. Decisione del Consiglio 1999/879/CE, del 17 dicembre 1999, relativa all'immissione sul mercato e all'impiego della somatotropina bovina (BST) e che abroga la decisione 90/218/CEE
  12. Direttiva 2003/74/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 che modifica la direttiva 96/22/CE del Consiglio concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze  $\beta$ -agoniste nelle produzioni animali
  13. 2002/657/CE: Decisione della Commissione, del 12 agosto 2002, che attua la Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (GUCE L221/8 del 17.08.2002). Precedentemente, con il nome di SANCO/1085/2000, era stata diffusa una bozza di revisione della Decisione 93/256/CE.
  14. Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n. 158: "Attuazione della direttiva 2003/74/CE, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione

ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali".

Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 98 del 28 aprile 2006.

15. Regolamento (CE) n. 470/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009 che stabilisce procedure comunitarie per la determinazione di limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale, abroga il regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio e modifica la direttiva 2001/82/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 726/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio
16. Decreto Legislativo 29 ottobre 2009, n. 148: "Attuazione della direttiva 2008/97/CE, che modifica la direttiva 96/22/CE concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali.
17. Regolamento (UE) N. 37/2010 della Commissione del 22 dicembre 2009 concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale.

#### **SITI INTERNET CONSULTATI:**

1. [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out21\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out21_en.pdf)
2. [http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc\\_2007\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf).
3. <http://www.europarl.europa.eu/news/it/>
4. <http://www.minerva.unito.it>
5. <http://www.treccani.it/enciclopedia/steroidi/>
6. [www.farmacovigilanza.org](http://www.farmacovigilanza.org)
7. [www.ilfattoalimentare.it](http://www.ilfattoalimentare.it)
8. [www.nuovaitaliamedica.it](http://www.nuovaitaliamedica.it)

## **9. RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare il Dott. Lorenzo Castiglieo e il Dott. Ranieri Verin per tutti gli insegnamenti ricevuti, per la pazienza, la precisione e la costanza con cui mi hanno seguito nella stesura di questo lavoro.

Ringrazio il Prof. Alessandro Poli per la sua disponibilità e per avermi aiutato nella corretta interpretazione dei preparati istologici.

Ringrazio con tutto il cuore i miei genitori per il grande amore e per la fiducia incondizionata che mi dimostrano ogni giorno.

Grazie a Tommaso, per essere un grande fratello e una persona su cui posso sempre contare.

Ringrazio Ciro, perché i suoi sguardi parlano più di mille parole.

Grazie a Francesca, per essermi sempre stata vicina, per aver creduto in me, per essere stata l'angelo che mi ha guidato nel raggiungere questo traguardo, e soprattutto per essere la persona speciale che è.

Ringrazio mia nonna Amilda, per i pensieri e le preghiere che mi accompagnano ogni giorno.

Un pensiero particolare a tutti i miei nonni e tutti i miei cari che non ci sono più, ma che mi vegliano da lassù.

E infine grazie a tutti i parenti e tutti gli amici con cui ho condiviso momenti intensi e speciali.

